

# Aufbau eines Reportergenassays zur Untersuchung der Wechselwirkung Endokriner Disruptoren mit der T<sub>3</sub>-regulierten Transaktivierung

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Dipl.-Biologe Peter Josef Hofmann**

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter/innen

1. Prof. Dr. Werner Kloas

2. Prof. Dr. Gudrun Brockmann

3. Prof. Dr. Josef Köhrle

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2008

## Zusammenfassung

Das Schilddrüsenhormon Triiodthyronin ( $T_3$ ) ist ein essenzieller Regulator wichtiger physiologischer Prozesse während der Entwicklung, des Wachstums und im Intermediärstoffwechsel. Über unterschiedliche Expositionswege werden täglich zahlreiche natürliche und synthetische Stoffe aufgenommen, die den endogenen Hormonhaushalt beeinflussen und deshalb als Endokrine Disruptoren (ED) bezeichnet werden. Die zentrale Frage einer direkten molekularen Interferenz mit den Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR) und ihrer transkriptionellen Aktivität wurde in dieser Arbeit behandelt. Zu diesem Zweck wurde ein neues  $T_3$ -Reportergensystem mit humanen Hepatokarzinomzellen aufgebaut. Nach Charakterisierung, Optimierung und Validierung stand mit diesem System ein spezifischer und sensitiver Assay zum Screening agonistischer oder antagonistischer Effekte ausgewählter Testsubstanzen auf die  $T_3$ -regulierte Transaktivierung zur Verfügung. Der synthetische Antagonist NH-3, eine der Referenzsubstanzen, wirkte als gemischter TR-Agonist/Antagonist, indem er bei Konkurrenz mit 1 nM  $T_3$  reprimierende und bei Inkubation ohne  $T_3$  schwach aktivierende Effekte auf die Reportergenaktivität hatte. Im Vergleich dazu wirkte eine weitere Referenzsubstanz, der synthetische Agonist GC-1, als ein reiner Agonist. Zur Bestimmung der endokrinen Aktivitäten einiger humanrelevanter Vertreter aus den Stoffkategorien der Nahrungsmittel, Kosmetika, Pestizide und Industriechemikalien wurden Dosis-Wirkungskurven in Aktivierungs- und  $T_3$ -Konkpetitionsexperimenten ermittelt. Von den 21 ED-Testsubstanzen waren 6 in Konzentrationen ab 1  $\mu$ M gemischte TR-Agonisten/Antagonisten. Nur Acetochlor wirkte als ein reiner Antagonist, während sich 9 der Testsubstanzen als schwache TR-Agonisten ab einer Mindestkonzentration von 1 bzw. 10  $\mu$ M in beiden Tests erwiesen. Vier Substanzen hatten nur im Aktivierungsassay einen agonistischen Effekt und Nitrofen zeigte keine Wirkung. Aufgrund ihrer hier beobachteten Effekte und der gegebenen Humanexposition durch die Substanzen wird eine eingehendere Analyse der antagonistisch wirkenden ED Tetrabromobisphenol A, Bisphenol A, 4-Methylbenzyliden Campher, 4-Nonylphenol, Acetochlor und Xanthohumol sowie den schwach agonistischen ED Genistein, Benzophenon 2, Benzophenon 3 und Octylmethoxycinnamat empfohlen. Außerdem erwiesen sich einige endogene Metaboliten von Schilddrüsenhormonen als überraschend potente Agonisten im  $T_3$ -Reportergenassay und bedürfen weiterer Aufmerksamkeit. Für die molekulare Charakterisierung der Einflüsse solcher Substanzen auf die  $T_3$ -regulierte Transaktivierung konnte mit dem hier etablierten Bioassay ein zuverlässiges neues Testsystem für reproduzierbare Screeningserien geschaffen werden.

## **Schlagwörter**

Endokriner Disruptor

Flammschutzmittel

Flavonoid

Luziferase

Pestizid

Reportergenassay

Rezeptor

Schilddrüsenhormon

Soja

UV-Filter

Weichmacher

Xenobiotika

## Summary

Triiodothyronine ( $T_3$ ) is a crucial regulator of many physiological processes during development, growth and metabolism. A variety of natural and synthetic substances are taken up on a daily base via diverse routes of exposition and are collectively termed endocrine disruptors (ED) due to their interference with the endogenous hormone homeostasis. This work was carried out to elucidate the potential molecular interference of certain ED with thyroid hormone receptors (TR) and their transcriptional activity. For that purpose a novel  $T_3$ -responsive reporter gene system was established that uses human hepatocarcinoma cells in culture. This assay proved to be a highly specific and sensitive tool for analyzing agonistic and antagonistic effects of various ED on the  $T_3$ -mediated transactivation of gene transcription. One of the reference compounds (NH-3) acted as a mixed TR agonist/antagonist by exerting repressing effects in competition experiments in the presence of 1 nM  $T_3$  and activating effects in the absence of  $T_3$ . Another reference compound (GC-1) was a pure agonist both in activation assays and in  $T_3$  competition assays. Dose response curves of the test compounds contained in food, cosmetics, pesticides, plasticizers and other industrial chemicals were determined by activation and competition assays. Six out of 21 test compounds were mixed agonists/antagonists in concentrations of 1  $\mu$ M or higher. Acetochlor was a pure antagonist while 9 of the remaining compounds displayed weak agonistic effects at minimal concentrations of 1 or 10  $\mu$ M in both assay types. Four ED were weak agonists in the activation assay and only nitrofen had no effect in the concentrations tested. With regard to their effects as determined in this bioassay and in light of the information known on human exposure in-depth follow-up studies are recommended to monitor and characterize the effects of some of these substances, i.e., the antagonists tetrabromobisphenol A, bisphenol A, 4-methylbenzyliden camphor, 4-nonylphenol, acetochlor and xanthohumol and the weak agonists genistein, benzophenone 2, benzophenone 3 and octylmethoxycinnamate. In addition some endogenous metabolites of thyroid hormones were surprisingly potent agonists in the  $T_3$  reporter gene assay and merit further attention. The novel bioassay established here represents a reliable tool for the screening and molecular characterization of substances interfering with  $T_3$ -mediated transactivation of gene expression.



## **Keywords**

endocrine disrupter

flame retardant

flavonoid

luciferase

pesticide

plasticizer

receptor

reporter gene assay

soy

thyroid hormone

UV-filter

xenobiotic

Die Durchführung der vorliegenden Arbeit erfolgte am Institut für Experimentelle Endokrinologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Diese Arbeit wurde durch die Europäischen Union im Rahmen des Projektes „EURISKED - Multi-organic Risk Assessment of selected Endocrine Disrupters“ sowie durch ein Promotionsstipendium der Charité – Universitätsmedizin Berlin gefördert.



## Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei meinen Betreuern, Herrn Prof. Dr. Josef Köhrle und Herrn Dr. Lutz Schomburg, für die Bereitstellung des Themas und des Arbeitsplatzes, für die fachliche Unterstützung und für konstruktive Diskussionen im Verlauf meiner Doktorarbeit. Auch für das angenehme Arbeitsklima und den freundschaftlichen zwischenmenschlichen Umgang am Institut für Experimentelle Endokrinologie möchte ich mich bei beiden herzlich bedanken, denn dies ist nicht zuletzt ihr Verdienst. Herrn Prof. Dr. Josef Köhrle danke ich auch für die zahlreichen Gelegenheiten, an Tagungen und anderen Informations- bzw. Fortbildungsveranstaltungen teilnehmen zu können und seine ausgeprägte und stete Bemühung um die Förderung der wissenschaftlichen Ausbildung von Nachwuchswissenschaftlern. Seine menschliche und korrekte Art hat mich sehr positiv beeindruckt.

Dr. Lutz Schomburg sei noch mein ganz spezieller Dank ausgesprochen, denn er hat neben einer freundschaftlichen und intensiven Betreuung auch im wahrsten Sinn des Wortes sein Hirn (Abb. 2 und 5) zum Gelingen und Verfeinern der Arbeit beigesteuert. Durch seine positive Grundeinstellung vermochte er immer wieder aufs Neue, die Stimmung zu heben, Mitarbeiter zu begeistern, Zukunftsvisionen zu entwickeln und Energie zur Bewältigung neuer Aufgaben zu mobilisieren. Wenn eine Person in seinem Umfeld eine Hilfestellung fachlicher, terminlicher oder auch privater Art benötigte, war Lutz immer zur Stelle und scheute auch spontane Nacht-Aktionen nicht. Diese Eigenschaften haben mich sehr beeindruckt und werden mir in bester Erinnerung bleiben.

Herrn Prof. Dr. Werner Kloas sei für die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit sowie für fachliche Diskussionen und praktische Hilfestellung mein herzlicher Dank ausgesprochen.

Frau Prof. Dr. Gudrun Brockmann danke sehr ich für die Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn Dr. Robert Opitz danke ich für das Überbringen von GC-1, GC-14, GC-24 und NH-3 sowie für zahlreiche fruchtbare fachliche Diskussionen und neue Ideen.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, mit denen ich eine schöne Zeit verbracht und viel erlebt habe. Im Speziellen bedanke ich mich bei Marten Michaelis (M.Sc.), Dipl.-Biol. Inka Hamann, Dipl.-Ing. Kostja Renko und Dipl.-Humanbiol. Susanne Piehl für fachliche und technische Hilfestellungen sowie eine ausgesprochen gute Zeit.

Für die Korrektur der Arbeit möchte ich mich herzlich bei Dipl.-Biol. Tobias Endermann, Dipl.-Biol. Thomas Behrends bedanken.

Meinen Eltern, meinem Bruder und vor allem meiner Ehefrau Melanie Hofmann danke ich für ihre familiäre Unterstützung aufs Herzlichste!

## Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>I</b>
<b>Schlagwörter .....</b>	<b>II</b>
<b>Summary .....</b>	<b>III</b>
<b>Keywords.....</b>	<b>IV</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>VI</b>
<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>X</b>
<b>1     <b>Einleitung</b>.....</b>	<b>1</b>
1.1   Endokrine Disruptoren (ED) .....	1
1.1.1   ED-Definition .....	1
1.1.2   Exposition .....	1
1.1.3   Wirkmechanismen von ED .....	2
1.1.4   Zielspektrum von ED im endokrinen System .....	4
1.1.5   Auswahl der Testsubstanzen .....	5
1.2   Die Schilddrüsenachse und ihre Hormone.....	5
1.2.1   Nukleäre Rezeptoren (NR).....	7
1.2.2   Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR).....	8
1.2.3   T <sub>3</sub> -responsive Elemente (TRE).....	10
1.2.4   Molekulare Wirkung von T <sub>3</sub> .....	11
1.2.5   Physiologische Wirkungen von T <sub>3</sub> und T <sub>3</sub> -Zielgenen .....	13
1.3   Reportergenassays .....	16
1.3.1   T <sub>3</sub> -Reportergenassays.....	17
1.4   Zielsetzung der Arbeit .....	18
<b>2     <b>Material und Methoden</b>.....</b>	<b>19</b>
2.1   Chemikalien.....	19
2.2   Lösungen, Puffer und Supplemente.....	19
2.3   Reaktionssysteme ( <i>Kits</i> ).....	19
2.4   Enzyme.....	20
2.5   Nukleinsäuren .....	20
2.5.1   Gekaufte bzw. geschenkte Plasmide .....	20
2.5.2   Oligonukleotide.....	21
2.5.3   DNA-Größenmarker .....	21
2.6   Bakterienstämme .....	22
2.7   Geräte.....	22
2.8   Verbrauchsmaterial .....	24
2.9   Spezielle Software.....	24
2.10   Datenbanken.....	24
2.11   Molekularbiologische Methoden .....	25
2.11.1   Isolation von Plasmid-DNA.....	25
2.11.2   Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration .....	25
2.11.3   Fällen von DNA .....	26
2.11.4   Ethanolische Fällung von DNA.....	26
2.11.5   DNA-Fällung mit Isopropanol .....	26
2.11.6   Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion .....	27
2.11.7   Lagerung von DNA.....	27
2.11.8   Restriktion von DNA .....	27
2.11.9   Gelelektrophorese von DNA.....	28

# INHALTSVERZEICHNIS

2.11.10	PCR	29
2.11.11	Colony PCR	30
2.11.12	DNA-Sequenzierung	30
2.11.13	Hybridisieren von Oligonukleotiden	30
2.11.14	Phosphorylierung von Oligonukleotiden	31
2.11.15	Ligation von Nukleinsäuren	31
2.11.16	Concatamerisierung von DNA-Fragmenten	31
2.11.17	Gelextraktion von DNA	31
2.12	Kultur von Bakterien	32
2.12.1	Suspensionskultur von Bakterien	32
2.12.2	Transformation von Bakterien	32
2.12.3	Bakterienkultur auf Nährstoffplatten	32
2.12.4	Lagerung von Bakterien als Glycerinkulturen	32
2.13	Zellkultur	33
2.13.1	Medien und Lösungen für die Zellkultur	33
2.13.2	Einwegartikel für die Zellkultur	33
2.13.3	Zelllinien	34
2.13.4	Allgemeine Kulturbedingungen	34
2.13.5	Kryokonservierung von Zellen	35
2.13.6	Auftauen von Kryostocks	35
2.13.7	Zellkultur auf Deckgläsern	36
2.13.8	Transfektion der Zellen	36
2.13.9	Mykoplasmen-Test	37
2.13.10	Vitalitätsassays	37
2.14	T <sub>3</sub> und T <sub>4</sub> Lösungen	37
2.14.1	Testsubstanzen	38
2.14.2	Fixieren von Zellen	40
2.14.3	Paraformaldehyd-Fixierung	40
2.14.4	X-gal Färbung	40
2.15	DAPI-Färbung	40
2.16	Mikroskopische Methoden	41
2.17	Proteinbiochemische Methoden	41
2.17.1	Lagerung von Proteinlösungen	41
2.17.2	Herstellen von Zelllysaten	41
2.17.3	Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford 1976)	41
2.17.4	Luziferase-Assay	42
2.17.5	Dual-Luciferase Assay	43
2.18	Statistische Analyse	44
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	Konstruktion von T <sub>3</sub> -Reportergenplasmiden	45
3.1.1	Klonierung von p(DR4) <sub>1</sub> -SV40- <i>luc</i> + und p(negTRE) <sub>1</sub> -SV40- <i>luc</i> +	45
3.1.2	Klonierung von p(DR4) <sub>2</sub> -SV40- <i>luc</i> + und p(negTRE) <sub>3</sub> -SV40- <i>luc</i> +	47
3.1.3	T <sub>3</sub> -Reportergenplasmide zur stabilen Transfektion	49
3.2	Charakterisierung und Optimierung des T <sub>3</sub> -Reportergenassays	50
3.2.1	Transfektionsoptimierung	50
3.2.2	Transfektionsoptimierung für 96-Well Platten	51
3.2.3	Vergleich der pGL3-Reportergenkonstrukte	52
3.2.4	Test der pBK-RSV-basierten Reporterplasmide	53
3.2.5	Vergleich von Zelllinien	54
3.2.6	Zeitabhängigkeit der T <sub>3</sub> -Dosis-Wirkung in HepG2	56
3.2.7	Effekte von Kulturmedium auf den Reporterassay	57
3.2.8	Einfluss der Zellzahl bei Transfektion in 96-Well	58
3.2.9	Bestimmung der optimalen Zellzahl/96-Well bei Pooltransfektionen	58
3.2.10	Vergleich unterschiedlicher TR	60
3.2.11	T <sub>3</sub> -Dosis-Wirkungskurven nach optimiertem Protokoll	61
3.2.12	Validierung mit dem synthetischen T <sub>3</sub> -Agonisten GC-1	62
3.2.13	Validierung mit dem synthetischen T <sub>3</sub> -Antagonisten NH-3	64
3.2.14	Validierung mit GC-1, GC-24 und NH-3 im TR $\beta$ -System	65
3.2.15	Untersuchung von Schilddrüsenhormonmetaboliten	67
3.3	Untersuchung der ED-Testsubstanzen	70

## INHALTSVERZEICHNIS

3.3.1	Screening von Nahrungsmittelbestandteilen.....	70
3.3.2	Screening von UV-Filtern aus Kosmetika.....	72
3.3.3	Screening von Pestiziden.....	73
3.3.4	Screening von Industriechemikalien.....	74
3.3.5	Untersuchung der Wirkung von F21388 auf den T <sub>3</sub> -Reporterassay.....	76
3.3.6	Effekte der Testsubstanzen auf die Zellvitalität.....	77
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>79</b>
4.1	Assay Aufbau, Charakterisierung und Optimierung.....	80
4.1.1	Optimierung für das 96-Well-Format.....	81
4.1.2	Vergleich der konstruierten Reporterplasmide.....	82
4.1.3	Stabil transfizierte Reporterzellen.....	82
4.1.4	Vergleich von Zelllinien.....	83
4.1.5	Vergleich von TR.....	84
4.1.6	Ermittlung der optimalen Inkubationsdauer.....	85
4.1.7	Effekte von Zellkulturmedium.....	85
4.2	Validierung des Systems.....	87
4.2.1	Validierung mit synthetischen Agonisten/Antagonisten.....	87
4.2.2	Validierung mit Schilddrüsenhormonmetaboliten.....	89
4.2.3	Vergleich mit anderen T <sub>3</sub> -Reporterassays.....	91
4.3	Limitationen und Vorteile des Assays.....	92
4.3.1	HepG2 als Zellmodell.....	92
4.3.2	Sekundäre Effekte der Testsubstanzen.....	93
4.3.3	TR-Isotypen-spezifische Effekte.....	93
4.3.4	Heterodimerisierung von TR.....	94
4.3.5	TRE-abhängige Effekte.....	94
4.3.6	Neue Modelle zur Schilddrüsenhormonwirkung.....	95
4.3.7	Vorteile des Assays.....	96
4.4	Alternative Assays.....	97
4.4.1	Alternative <i>in vitro</i> Assays.....	97
4.4.2	<i>In vivo</i> Assays.....	99
4.4.3	Vergleich von <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Assays.....	100
4.5	Screening der Testsubstanzen.....	101
4.5.1	Testsubstanzen aus der Gruppe der Nahrungsmittelbestandteile.....	103
4.5.2	Testsubstanzen aus der Gruppe der UV-Absorbern aus Kosmetika.....	106
4.5.3	Screening von Pestiziden.....	109
4.5.4	Screening von Industriechemikalien.....	110
4.5.5	F21388.....	114
4.5.6	Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem ED-Screening.....	114
4.5.7	Ausblick.....	117
	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>119</b>
	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>120</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>121</b>
	<b>Publikationsverzeichnis.....</b>	<b>148</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>153</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>154</b>

## Abkürzungsverzeichnis

3-T <sub>1</sub>	3-Iod-L-thyronin	F21388	synthetisches Flavonoid
3'-T <sub>1</sub>	3'-Iod-L-thyronin	FBS	fötales bovines Serum ( <i>fetal bovine serum</i> )
3,3'-T <sub>2</sub>	3,3'-Diiod-L-thyronin	FGFR	Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
3,5-T <sub>2</sub>	3,5-Diiod-L-thyronin	FLuc	Leuchtkäfer-Luziferase ( <i>firefly luciferase</i> )
3',5'-T <sub>2</sub>	3',5'-Diiod-L-thyronin	GC-1	synthetischer TR-Agonist
		GC-24	synthetischer TR-Agonist
abs.	absolut	GEN	Genistein
ACETO	Acetochlor	GH	Wachstumshormon ( <i>growth hormone</i> )
ACTR	activator for thyroid hormones and retinoid receptor	GLuc	Gaussia-Luziferase ( <i>gaussia luciferase</i> )
AF	Aktivierungsfunktion	GLUT	Glucosetransporter
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )	GR	Glucocorticoidrezeptor
API	Apigenin	GRIP1	GR interacting protein 1
ApoA1	Apolipoprotein A-I		
AR	Androgenrezeptor	h	Stunde(n) ( <i>hour</i> )
AS	Aminosäure(n)	H <sub>2</sub> O bidest.	zweifach destilliertes Wasser ( <i>aqua bidestillata</i> )
ATCC	American Type Culture Collection	HAT	Histon-Acetyltransferase
		HCN2	hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2
bp	Basenpaar(e)	HDAC	Histon-Deacetylase
BP2	Benzophenon-2	HEPES	N'-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
BP3	Benzophenon-3		
BPA	Bisphenol A	HIS	Hispidulin
BTEB	basic transcription element-binding protein	HRE	Hormon-responsive Elemente
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )	hTR	humaner TR
CAS	Chemical Abstracts Service	IP6	inverted palindrome 6, ein TRE
c-erbα2	cellular homolog of the avian erythroblastosis virus, auch TRα <sub>2</sub>		
CoA	Koaktivator ( <i>coactivator</i> )	JPEG	(joint photographic experts group)-Format (ein Grafik-Dateiformat)
CoR	Korepressor ( <i>corepressor</i> )		
CRABP	Zelluläres Retinsäure-bindendes Protein	kb	Kilobase(n)
CBP/p300	CREB-binding protein		
CREDO	Cluster for Research on Endocrine Disruption in Europe	LBD	Liganden-Binde-Domäne
C-terminal	Carboxy-terminal	LDL-C	low-density lipoprotein-cholesterin
cTR	Hühner TR ( <i>chicken TR</i> )	LIN	Linuron
Cyp7	Cholesterin-7α-Hydroxylase	LOEC	niedrigste Konzentration einer Substanz, die einen statistisch signifikanten Effekt auf ein Testsystem hat ( <i>lowest observed effect concentration</i> )
d	Tag ( <i>day</i> )	LXR	Leber-X-Rezeptor
Da	Dalton, Masseneinheit (1 Da = 1 g/mol)		
DAD	deacetylase activating domain	MAPK	mitogen-activated protein kinase
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	MEBM	mammary epithelium basal medium
DBD	DNA-Binde-Domäne	MEGM	mammary epithelium growth medium
DBP	Dibutylphthalat	MHC	Myosin Schwere Kette ( <i>myosin heavy chain</i> )
DIO1	Deiodase Typ I	min	Minute(n)
DIO2	Deiodase Typ II	MR	Mineralocorticoidrezeptor
DIO3	Deiodase Typ III	mTOR	mammalian target of rapamycin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium	MYR	Myristicin
DMEM/F12	1:1-Mischung von DMEM und F12		
DMSO	Dimethylsulfoxid	NAR	Naringenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )	NCoA2	nuclear receptor coactivator 2
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat	NCoR	nuclear receptor corepressor
dsDNA	doppelsträngige DNA ( <i>double stranded</i> )	NEET	Natrium-EDTA-Ethanol-Tris
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan	NH-3	synthetischer TR-Antagonist
DR4	direct repeat 4, ein TRE	NIS	Natrium-Iodid-Symporter
DRIP	vitamin-D-receptor-interacting protein	NIT	Nitrofen
		NLS	Kernlokalisierungssignal ( <i>nuclear localization signal</i> )
ED	Endokriner Disruptor	NR	Nukleärer Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure ( <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i> )	N-terminal	Amino-terminal
EGFP	enhanced green fluorescent protein		
eNOS	endotheliale NO (Stickstoffmonoxid)-Synthase	OATP	organic anion-transporting polypeptide
ER	Östrogenrezeptor ( <i>estrogen receptor</i> )	OMC	Octylmethoxycinnamat
et al.	und andere		
EtOH	Ethanol	P	Phosphatgruppe, in Abbildungen
EURISKED	Multi-organic Risk Assessment of Selected Endocrine Disrupters	p.a.	pro analysi
E <sub>x</sub>	Extinktion bei einer Wellenlänge von x nm	PAL	palindrome, ein TRE
		PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
F12	Ham's Nutrient Mixture F-12	PCAF	p300/CBP-associated factor

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )	TEDTA	Trypsin- <b>EDTA</b> -Lösung
PCB	Polychlorierte Biphenyle	TF	Transkriptionsfaktor
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase	Tg	Thyreoglobulin
PFA	Paraformaldehyd	TH	Schilddrüsenhormon ( <i>thyroid hormone</i> )
P <sub>i</sub>	Orthophosphat, anorganisches Phosphat ( <i>inorganic phosphate</i> ) in Abbildungen	THDP	Schilddrüsenhormon Distributorprotein ( <i>thyroid hormone distributor protein</i> )
PI 3-Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase	ThOx	<b>Thyroxidase</b>
POP	Persistente Organische Schadstoffe ( <i>persistent organic pollutants</i> )	TH-System	Schilddrüsenhormon-System
PPAR	Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor	TIF2	<i>transcriptional intermediary factor 2</i>
PR	Progesteronrezeptor	Tiff	<i>tagged-image file format</i> (ein Grafik-Dateiformat)
PRO	Procymidon	TPO	Thyreoperoxidase
		TRAP	<i>thyroid-hormon-receptor-associated protein</i>
QUE	<b>Quercetin</b>	TR	<i>thyroid hormone receptor</i>
RES	<b>Resveratrol</b>	TRE	<b>T<sub>3</sub>-responsive Elemente</b>
RAR	Retinsäure-Rezeptor	TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
REACH	<i>Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals</i>	TRIAC	3,3',5'-Triiod-thyroessigsäure
RLU	<i>relative light unit</i>	Tris	<b>tris</b> (hydroxymethyl)aminomethan
RLuc	Renilla-Luzifease ( <i>renilla luciferase</i> )	Tris-HCl	<b>Tris</b> -(hydroxymethyl)- Aminomethan-Hydrochlorid
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )	TSH	Thyreotropin, Thyreoidea Stimulierendes <b>Hormon</b>
RT	Raumtemperatur	TSHr	<b>TSH-Rezeptor</b>
rT <sub>3</sub>	3,3',5'-Triiod-L-thyronin ( <i>reverse T<sub>3</sub></i> )	TTR	Transthyretin
rTR	<b>Ratten TR</b>	U	Enzymeinheit ( <i>unit</i> )
RXR	Retinsäure- <b>X-Rezeptor</b>	UCP	<i>uncoupling protein</i>
		ü. N.	über Nacht
SD	Standardabweichung ( <i>Standard Deviation</i> )	ÜS	<b>Überstand</b>
SEM	Standardfehler ( <i>Standard Error of the Mean</i> )	US-EPA	<b>US Environmental Protection Agency</b>
SERCA	sarkoendoplasmatisches Retikulum- <b>Ca<sup>2+</sup>-ATPase</b>	UV	ultraviolett
SIL	<b>Silymarin</b>	v/v	Volumenprozent ( <i>volume over volume</i> )
SMRT	<i>silencing mediator for retinoid and thyroid receptors</i>	VDR	<b>Vitamin D Rezeptor</b>
SRC-1	<i>steroid receptor coactivator 1</i>	Vol.	<b>Volumen</b>
ssDNA	einzelsträngige DNA ( <i>single stranded</i> )	w/o	ohne ( <i>without</i> )
		w/v	Gewicht/Volumen ( <i>weight over volume</i> )
T <sub>0</sub>	Thyronin	XEMA	<b>Xenopus-Metamorphose-Assay</b>
T <sub>3</sub>	<b>3,3',5'-Triiod-L-thyronin</b>	XN	<b>Xanthohumol</b>
T <sub>4</sub>	<b>3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin</b>		
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
Taq	Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>		
TBBPA	Tetrabromobisphenol <b>A</b>		
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin		
TE	Tris-HCl/EDTA		



## 1 Einleitung

### 1.1 Endokrine Disruptoren (ED)

#### 1.1.1 ED-Definition

Das endokrine System von Vertebraten kontrolliert durch seine Hormone auf komplexe Weise zentrale Vorgänge, wie Entwicklung, Wachstum, Stoffwechsel und Verhalten. Störungen des endokrinen Systems können starke Auswirkungen auf die Entwicklung, die Gesundheit und das Wohlbefinden eines Organismus haben. Als Endokrine Disruptoren (ED) werden exogene Substanzen (oder Mixturen) bezeichnet, die durch Interferenz mit dem Hormonsystem eine adverse Wirkung auf die Funktion und somit die Gesundheit eines intakten Organismus, seiner Nachkommen oder einer (Sub-) Population des Organismus haben (European Commission 1996). Diese recht weit gefasste Definition schließt aber auch Chemikalien der klassischen Toxikologie ein, die beispielsweise durch Veränderung der metabolischen Homöostase, durch Stresserscheinungen oder durch Modifikation der Genexpression Effekte auf das endokrine System ausüben. Deshalb wurde zur Präzisierung dieser Definition vorgeschlagen, dass ED sich durch eine spezifische Wirkung auf das endokrine System auszeichnen und kein relevantes klassisches toxisches Potenzial aufweisen, welches indirekt auch die Funktion des Hormonsystems beeinflussen könnte (Kloas 2002). Seit dem Erscheinen des Buchs „Silent Spring“ (Carson 1962) über die Gefahren des unkontrollierten Einsatzes von Pestiziden sind ED zunehmend in das Interesse von Politik und Populärwissenschaft gerückt.

#### 1.1.2 Exposition

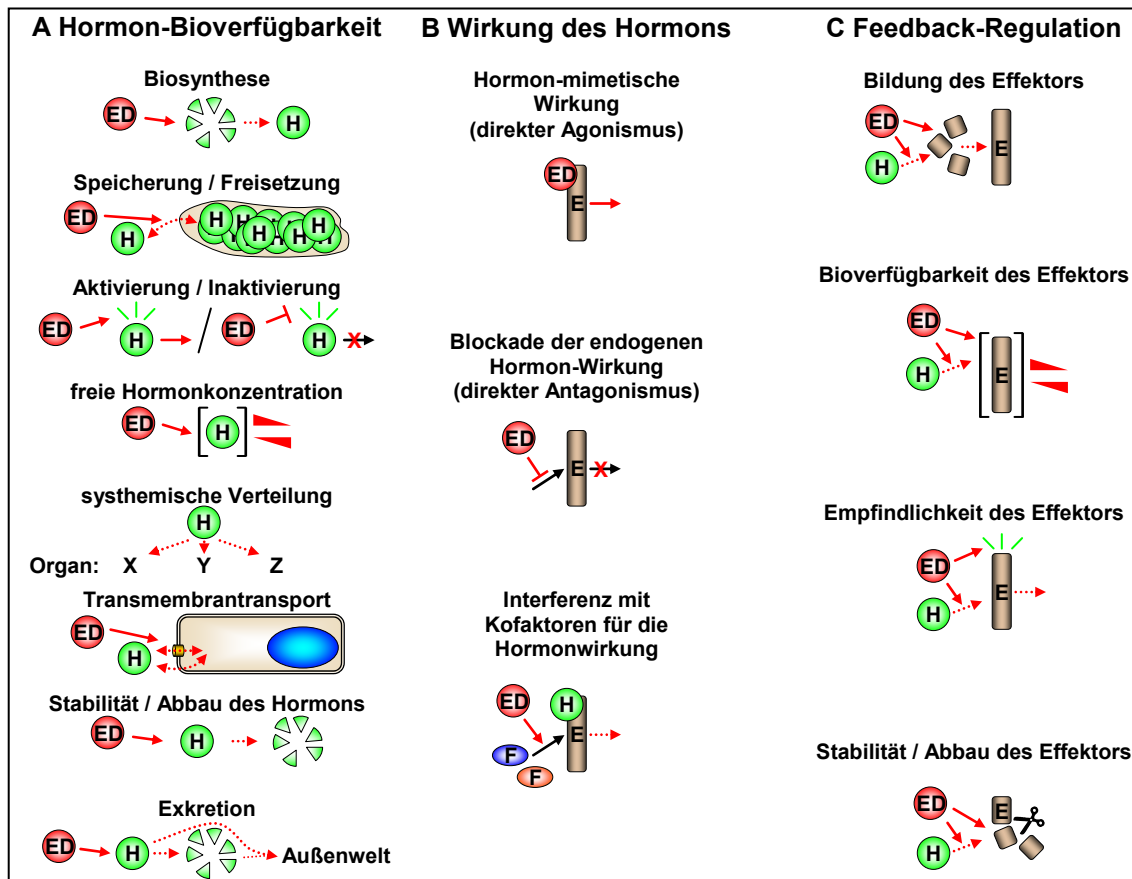
Bei Exposition während kritischer Phasen der Entwicklung von Organismen können durch ED permanente und irreversible Schädigungen des heranwachsenden Organismus hervorgerufen werden (McLachlan et al. 1975). Ein Großteil von ED ist antropogenen Ursprungs. So haben manche UV-Absorber aus Kosmetika (Schmutzler et al. 2004; Schlumpf et al. 2004b; Schlumpf et al. 2004a; Jarry et al. 2004) oder Weichmacher in Kunststoffen (Schmutzler et al. 2004; Moriyama et al. 2002; Schönfelder et al. 2002b; Schönfelder et al. 2002a) eine nachweisbare ED-Aktivität. Ebenso stellen einige Pestizide, wie Fungizide und Herbizide (Anway et al. 2005; Fei et al. 2005) sowie bestimmte Brandschutzmittel (Siddiqi et al. 2003; Talsness et al. 2005; Kuriyama et al. 2005) potente ED dar. Humanrelevante ED können aber auch natürlichen Quellen entstammen, z. B. der Nahrung oder Nahrungsergänzungsmitteln (Baker 1998; Mennen et al. 2005; Köhrle et al. 1988) und Phytotherapeutika (Köhrle et al. 1988; Elnour et al. 1998; Tuohy 2003).

Aufgrund ihrer chemisch oft sehr stabilen und hydrophoben Natur akkumulieren viele ED als sogenannte „Umweltchemikalien bzw. -hormone“ oder „Persistente Organische Schadstoffe (*persistent organic pollutants*, POP)“ in der Umwelt und im Fettgewebe von Tier und Mensch, was zu einer generellen Bioakkumulation, auch in der Nahrungskette oder der Muttermilch führt (Toppari 2002). Die Exposition der Parentalgeneration zu einer unbestimmten Zeit während ihres Lebens kann z. B. durch Mobilisierung von persistenten ED im Körperfett im Laufe der Schwangerschaft oder der Stillzeit zur Exposition und Schädigung des Nachwuchses, also zu transgenerationalen Effekten, führen (Colborn et al. 1993). Es gibt auch Berichte über transgenerationale Effekte von ED, bei denen ein ED-exponierter Organismus eine Noxe über epigenetische Mechanismen an die nächste Generation weitergibt (Cooke et al. 2004; Anway et al. 2005; Ahmed 2000; Fox et al. 2001; Fox et al. 2004; Skinner 2007; Crews et al. 2007; Jirtle und Skinner 2007). Aber auch adulte Organismen können durch eine hochkonzentrierte oder chronische ED-Exposition einem temporären oder dauerhaften Gesundheitsrisiko ausgesetzt sein (Brawer et al. 1978).

### 1.1.3 Wirkmechanismen von ED

Durch den Einfluss auf hormonelle Regulationsnetzwerke beeinträchtigen ED physiologische Funktionen. Als mögliche Wirkmechanismen von ED kommen unterschiedliche molekulare und physiologische Szenarien in Frage. So kann die normale Bioverfügbarkeit von aktiven Hormonen in einem Organismus durch eine Interferenz auf verschiedenen Ebenen des Hormonhaushalts beeinträchtigt werden (Abb. 1A). Hierzu zählen Interferenzen von ED mit der Biosynthese, Speicherung, Freisetzung, Aktivierung, Inaktivierung und Exkretion von Hormonen. Auch der systemische Transport durch Hormontransport- und Bindeproteine sowie der zelluläre Transmembrantransport vermittelt durch spezielle Transmembrantransporter kann z. B. durch kompetitive Bindung von ED beeinflusst werden. Daraus resultiert eine Änderung der freien Hormonkonzentration, die laut der „Freien Hormontransport Hypothese“ (Mendel 1992) als exklusive Quelle für die zelluläre Hormonaufnahme angesehen wird. Neben diesen Effekten kann ein direkter Hormon-Agonismus auftreten, wenn ein ED ein Effektmolekül, beispielsweise einen Nukleären Hormonrezeptor, bindet und dadurch die Wirkung des natürlichen Hormons verstärkt oder zur falschen Zeit bzw. im falschen Kompartiment ausübt (Abb. 1B). Bindet eine Substanz einen Hormonrezeptor, aktiviert ihn aber nicht und verhindert dabei die Bindung des natürlichen Hormons, resultiert dies in einem antagonistischen Effekt. Ebenso kann die normale Feedback-Regulation durch ED auf mehreren Ebenen beeinträchtigt werden (Abb. 1C). So

können ED die Sensitivität übergeordneter Strukturen der Hormonachse für die Rückkopplungswirkung eines Hormons vermindern oder verstärken. Weitere Angriffspunkte von ED können die Bildung und die Bioverfügbarkeit der Hormon-Effektoren sein. Durch molekulare Modifikation der Effektoren, beispielsweise eine Änderung im Phosphorylierungsstatus von Hormonrezeptoren, kann deren Empfindlichkeit für ihr Hormon und die Wirkung nach Hormonbindung beeinflusst werden (Jones et al. 1994).



**Abb. 1: Beispiele für Wirkmechanismen von ED**

ED können auf unterschiedliche Weise mit dem endokrinen System interferieren. Die normale Bioverfügbarkeit (aktiver) Hormone kann durch ED empfindlich gestört werden, indem Prozesse, wie Biosynthese, Speicherung, Freisetzung, Aktivierung, Inaktivierung, Homöostase der freien Hormonkonzentration, systemische Verteilung, Transmembrantransport, Stabilität, Abbau oder Exkretion der betroffenen Hormone H durch ED beeinträchtigt werden (A). Durch eine Hormon-mimetische Interaktion mit bestimmten Hormon-Effektoren E, wie Hormon-Rezeptoren, können ED als direkte Agonisten wirken. Wenn ein ED keine oder eine schwächere aktivierende Wirkung als das endogene Hormon besitzt, aber durch die Bindung an Effektormoleküle das endogene Hormon verdrängt, dann tritt ein direkter Antagonismus auf. Auch durch die Interferenz mit Kofaktoren F können ED agonistische oder antagonistische Effekte hervorrufen. Die Beeinträchtigung der Feedback-Regulation stellt einen weiteren möglichen Wirkmechanismus von ED dar (C). Hierbei wird z. B. die Sensitivität übergeordneter Strukturen der Hormonachse für die Rückkopplungswirkung des durch die Effektordrüse oder -zelle freigesetzten Hormons gestört bzw. amplifiziert. Konkret können die Hormon-vermittelte Bildung, die Bioverfügbarkeit, die Empfindlichkeit, die Stabilität und der Abbau von Effektoren durch ED beeinträchtigt werden. Ebenso können ED solche Vorgänge auch bei Effektoren, die nicht in einem Rückkopplungsverhältnis ihres Hormons stehen, beeinflussen und so das Hormonsystem stören.

Außerdem unterliegen ED als körperfremde Stoffe - anders als endogene Hormone - nicht der natürlichen physiologischen Regulation, z. B. in Bezug auf ihre Aktivierung/Inaktivierung, ihren Abbau und die Exkretion. Das endokrine System beinhaltet also zahlreiche, miteinander in komplexen Beziehungen stehende, potenzielle Ziele für eine Störung durch ED.

### **1.1.4 Zielspektrum von ED im endokrinen System**

Die meisten Erkenntnisse über ED stammen aus Studien zur Wirkung auf die Reproduktionsachse, so z. B. auf die Entwicklung sekundärer Geschlechtsmerkmale und die Fertilität, die sich relativ einfach und nicht-invasiv analysieren lassen. Hier dominieren besonders Xenoöstrogene und östrogene Wirkungen die Literatur seit den 1990er Jahren (Guillette 2006). Frühe ED-Studien berichten über eine reduzierte Fertilität sowie eine Demaskulinisierung oder Defeminisierung und die damit einhergehenden Fortpflanzungsrückgänge bei Säugetieren (Reijnders 1986), Vögeln (Fry und Toone 1981), Reptilien (Bishop et al. 1991; Guillette et al. 1994), Fischen (Sumpter 1995) und Mollusken durch Umweltkontaminanten, wie Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) und Polychlorierte Biphenyle (PCB). Der Einfluss von ED auf die humane Reproduktion, speziell auf die männliche, ist im Fokus zahlreicher Studien und kontroverser Diskussionen (Toppari et al. 2002; Safe 2000; McLachlan 2001).

Für diese Prozesse sind die Sexualsteroiden und ihre spezifischen Rezeptoren aus der Familie der Nukleären Rezeptoren (NR) von zentraler Bedeutung. Da diese Transkriptionsfaktoren (TF) eine nahe phylogenetische und strukturelle Beziehung zu den entsprechenden Kernrezeptoren der anderen Hormonachsen aufweisen, liegt eine genauere Analyse der Effekte von ED auch auf diese Systeme nahe (McLachlan 2001). Neben charakterisierten Effekten auf die gonadotrope Hormonachse werden zunehmend auch ED der Hypophysen-Schilddrüsen-Achse erkannt (Schmutzler et al. 2004; Schlumpf et al. 2004b; Houtman et al. 2004; Khan et al. 2002; Van Wyk et al. 1959; Hydovitz 1960; RIPP 1961).

Zur Analyse und Risikobewertung eben solcher interferierender Wirkungen von ausgewählten Substanzen auf unterschiedliche Hormonachsen haben sich internationale Arbeitsgruppen mit fachlicher Kompetenz in der Erforschung der jeweiligen Achse zu einem Verbund (EURISKED - Multi-organic Risk Assessment of Selected Endocrine Disrupters, <http://www.eurisked.org/index.htm>) zusammengeschlossen. EURISKED wurde innerhalb des Fünften Rahmenprogramms der Europäischen Union (<http://www.cordis.lu/fp5>) gefördert und war zusammen mit

drei anderen Projekten (COMPRENDO, EDEN, FIRE) Teil in dem Projekt-Cluster CREDO (Cluster for Research on Endocrine Disruption in Europe, <http://www.credocluster.info/>). Im Rahmen von EURISKED sollten durch diese Arbeit die Effekte von Testsubstanzen auf die Schilddrüsenhormon-regulierte Genexpression untersucht werden.

### 1.1.5 Auswahl der Testsubstanzen

Auswahlkriterien für die Testsubstanzen waren ihre Humanrelevanz, z. B. in Bezug auf Massenproduktion, Einsatz in großem Umfang und Humanexposition, Effekte auf andere Hormonachsen oder strukturelle Verwandtschaft mit Hormonen. Es wurden Substanzen aus unterschiedlichen Verwendungsklassen in die Untersuchungen einbezogen. Darunter waren Nahrungsmittelinhaltsstoffe und Nahrungsergänzungsmittel, wie Genistein (GEN), Resveratrol (RES), Silymarin (SIL) und Xanthohumol (XN). Eine weitere Gruppe von Testsubstanzen stellten UV-Absorber aus Kosmetika dar. Aus dieser Gruppe wurden Benzophenon 2 (BP2), Benzophenon 3 (BP3), 4-Methylbenzyliden Campher (4MBC) und Octylmethoxycinnamat (OMC) getestet. Zu den in die Analysen einbezogenen Pestiziden gehörten Acetochlor (ACETO), Linuron (LIN), Nitrofen (NIT) und Procymidon (PRO). Verschiedene Industriechemikalien und Weichmacher wurden ebenfalls untersucht, darunter befanden sich Bisphenol A (BPA), Dibutylphthalat (DBP), 4-Nonylphenol (4NP) und das Flammschutzmittel 3,3',5,5'-Tetrabromobisphenol A (TBBPA). Eine detaillierte Beschreibung dieser Testsubstanzen erfolgt in Kapitel 7.5.

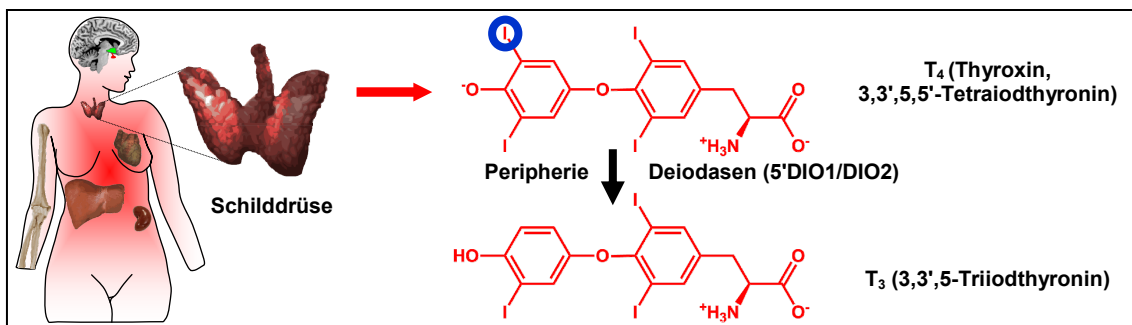
### 1.2 Die Schilddrüsenachse und ihre Hormone

Endokrine Netzwerke und hormonelle Regulationsmechanismen sind für Entwicklung, Wachstum, Physiologie und Adaptation an äußere Störungen von entscheidender Bedeutung. Dies trifft besonders für die Schilddrüsenhormonachse und ihre Hormone Thyroxin ( $T_4$ ) und Triiodthyronin ( $T_3$ ) zu (Oetting und Yen 2007). Eine  $T_3$ -Defizienz während der embryonalen Entwicklung führt zu Wachstumsstörungen und schwerer mentaler Retardierung (Nunez 1984; Porterfield und Hendry 1998; Hetzel 2000). Im adulten Organismus spielt  $T_3$  eine wichtige Rolle in der metabolischen Homöostase (Gewichts- und Thermokontrolle), für die Herzfunktion (Frequenz, Zeitvolumen) und das psychoneurologische Wohlbefinden (Tag-Nacht Rhythmus, Stimmung) (Yen 2001). Schilddrüsenerkrankungen können überdies zu psychiatrischen Manifestationen führen (Bauer und Whybrow 2001; Joffe und Sokolov 1994). Somit hat die normale Funktion

des Schilddrüsenhormonsystems eine wichtige biologische, medizinische und auch soziale Bedeutung.

Die Schilddrüsenhormone  $T_4$  und  $T_3$  werden unter Kontrolle des Hypophysenhormons Thyreotropin (Thyroidea Stimulierendes Hormon, TSH), das von den thyreotropen Zellen der Adenohypophyse produziert wird, in der Schilddrüse synthetisiert (Yen 2001). Die Sekretion von TSH wiederum wird durch das hypothalamische Hormon TRH (Thyreotropin Releasing Hormon) reguliert.  $T_3$  wirkt inhibierend auf die Biosynthese und Freisetzung von TRH sowie TSH, was Basis des negativen Rückkopplungssystems der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenhormonachse ist (Dyess et al. 1988; Zoeller et al. 2007a). Dieser Feedbackmechanismus ist so präzise, dass die Beziehung von TSH und  $T_4$  zur Diagnose vieler Schilddrüsenerkrankungen herangezogen wird.

Durch den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) wird Iodid aktiv von den Thyreozyten aufgenommen (Dai et al. 1996; Riesco-Eizaguirre und Santisteban 2006) und daraufhin durch Pendrin in das Follikellumen abgegeben. Das Enzym Thyrooxidase (ThOx) synthetisiert  $H_2O_2$ , das im Kolloidlumen der Thyroperoxidase (TPO) zur Oxidierung des Iodids dient. Außerdem synthetisieren die Thyreozyten das Glykoprotein Thyreoglobulin (Tg) und sezernieren es in das Follikellumen. Schließlich werden Tyrosylreste des Tg in einem Prozess, den man „Organifizierung“ nennt, iodiert. Durch diese Iodierung entstehen Monoiodtyrosyl-Reste (MIT) und Diiodtyrosyl-Reste (DIT) im Tg-Molekül (Yen 2001). Diese Iodtyrosyl-Reste werden mithilfe von  $H_2O_2$  und TPO gekoppelt und es entstehen, je nach Kombination, die Iodthyronine  $T_4$  und  $T_3$ . Durch die von TSH-regulierte lysosomale Proteolyse des Tg wird  $T_4$  und zum kleineren Teil  $T_3$  freigesetzt und ins Blut sezerniert.



**Abb. 2: Konvertierung des Schilddrüsenhormons  $T_4$  in das biologisch aktive  $T_3$**

In der Schilddrüse erfolgt die Biosynthese von  $T_4$ . Nach Sekretion in das Blut und Transport durch spezielle Plasmaproteine wird  $T_4$  von den Zielzellen der Peripherie aufgenommen. Eine Gruppe von Selenoenzymen, die Deiodasen, konvertieren  $T_4$  durch Abspaltung eines Iodatoms zum biologisch aktiven  $T_3$  oder katalysieren dessen Inaktivierung. Die beiden für die TH-Synthese und die Feedbackregulation entscheidenden Strukturen des Zentralnervensystems – Hypothalamus und Hypophyse – sind die grün bzw. rot eingefärbten Bereiche des Hirns. Einige wichtige Zielorgane von  $T_3$  (Herz, Leber, Knochen, Niere) sind ebenfalls abgebildet und die Schilddrüse wird durch eine vergrößerte Darstellung hervorgehoben.

Ein nicht unerheblicher Teil des  $T_4$  wird mittels bestimmter Selenoenzyme, den Deiodasen DIO1 und DIO2, schon in der Schilddrüse in 5'-Position deiodiert und als  $T_3$  sezerniert (Köhrle 2000; Bianco und Kim 2006; Köhrle 2007). Durch Bindung an die drei extrazellulären TH-Transport- oder TH-Verteilungsproteine (THDP) des Blutes, Thyroxin-bindendes Globulin (TBG), Transthyretin (TTR) und Albumin, werden die Hormone im Blut gebunden, systemisch verteilt und zu den Zielorganen transportiert (Richardson 2007). Nach Aufnahme von  $T_4$  durch die Zellen der peripheren Zielorgane durch zelluläre Transmembrantransporter, wie Monocarboxylat-Transporter 8 (MCT8) (Friesema et al. 2006) und 10 (MCT10) (Visser et al. 2007) sowie OATP1C1 (*organic anion-transporting polypeptide*) (Friesema et al. 2005), wird es durch 5'-Deiodierung zum biologisch aktiven  $T_3$  konvertiert (Abb.2).  $T_3$  entfaltet seine physiologische Wirkung in erster Linie über Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR), welche im Menschen von den zwei Genen *THRA* auf Chromosom 17 und *THRB* auf Chromosom 3 codiert werden (Weinberger et al. 1986; Sap et al. 1986; Evans 1988; Mangelsdorf et al. 1995; Lazar 1993). TR gehören aufgrund ihrer Sequenzhomologie zur Superfamilie der Nukleären Rezeptoren, zu denen auch Steroid-, Retinsäure-, Vitamin D-, Cholesterin-, Gallensäurederivat- und Orphan-Rezeptoren, deren Liganden noch nicht identifiziert werden konnten, gehören (McKenna und O'Malley 2002).

### 1.2.1 Nukleäre Rezeptoren (NR)

Die Mitglieder der Superfamilie von Nukleären Rezeptoren (NR) sind Liganden-modulierte TF, die an der Regulation von Reproduktion, Entwicklung und Stoffwechsel beteiligt sind (Evans 2005). NR kommen in allen Metazoen vor - es sind 48 humane NR bekannt - und stammen evolutionär vermutlich von einem gemeinsamen Vorläufer ab, denn sie zeichnen sich durch eine gleichartige grundlegende Struktur aus (Evans 1988). Sie besitzen eine N-terminale AB-Domäne mit der Liganden-unabhängigen Aktivierungsfunktion 1 (AF-1), eine DNA-Binde-Domäne (DBD), eine flexible Gelenkdomäne mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS) und eine Liganden-Binde-Domäne (LBD) aus ca. 250 vorwiegend hydrophoben Aminosäuren, die in den meisten NR eine Ligandenbindetasche aus 12  $\alpha$ -Helices bilden (Abb. 3A) (Kishimoto et al. 2006). Von den 12 Helices der LBD tragen die Helices 3, 5, 6 und 12 zur Interaktion mit Koaktivatoren (CoA) der Zielgenexpression bei und die Bindung von Korepressoren (CoR) der Zielgenexpression wird durch ein Zusammenspiel von Helix 3, 4, 5 und 6 vermittelt (Oetting und Yen 2007). Helix 12 enthält die Liganden-abhängige Transaktivierungsdomäne AF-2 (Aktivierungsfunktion 2) (Ortiga-Carvalho et al. 2005). Die Bindung des Liganden induziert ein strukturelles Rearrangement der C-terminalen

Helix 12, was zu einer Verdrängung von CoR und zur Bindung von CoA und somit zur Zielgentranskription führt (Tasset et al. 1990; Malm et al. 2007). Die Liganden von NR sind in der Regel hydrophobe Signalmoleküle, wie Östrogene, Androgene, Glucocorticoide, Schilddrüsenhormone, Cholesterinderivate und Vitamin D<sub>3</sub>. Jedoch deutet die Entdeckung, dass Glucose den Leber-X-Rezeptor (LXR) binden und seine transkriptionelle Aktivität stimulieren kann (Mitro et al. 2007), darauf hin, dass auch manche hydrophile Moleküle als Liganden von NR in Betracht gezogen werden müssen. Indem NR mit ihrer DBD an spezifische Konsensus Sequenzen - die Hormonresponsiven Elementen (HRE) - in den Zielgen-Promotoren binden, regulieren sie durch Rekrutierung von CoA oder CoR die Transkription dieser Zielgene (Yen et al. 2006).

Die NR wurden ursprünglich in zwei Typen unterteilt. Typ I NR sind als Aporezeptor an Hitzeschockproteine gebunden im Zytoplasma (z. B. Glucocorticoidrezeptor) oder im Nukleus (z. B. Östrogenrezeptor  $\alpha$ ) lokalisiert und können erst nach Ligandenbindung ihre *inverted repeat*-HRE als Homodimere oder auch Monomere im Zellkern binden. Typ II NR binden ihre HRE in den Promotoren oder in intronischen Sequenzen der Zielgene schon in der Abwesenheit von Liganden, also als Aporezeptor. Sie binden meist als Heterodimere mit Retinsäure-X-Rezeptor (RXR) an ihre HRE, die als direkte Wiederholungen der Konsensus-HRE Hälfte (Direct Repeats, DR) angeordnet sind (Mahajan und Samuels 2005). Mitglieder der Typ I NR sind z. B. Glucocorticoidrezeptor (GR), Östrogenrezeptor (ER), Progesteronrezeptor (PR), Mineralocorticoidrezeptor (MR), und Androgenrezeptor (AR). Zu den Typ II NR gehören neben dem TR unter anderem auch die Vitamin D Rezeptoren (VDR), Retinsäure Rezeptoren (RAR), RXR und Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptoren (PPAR). RXR/TR Heterodimere binden TRE in einer 5'→3' Polarität, bei der RXR strangaufwärts lokalisiert ist (Kurokawa et al. 1993; Perlmann et al. 1993; Yen et al. 1994). Der Abstand zwischen zwei DR bestimmt die Spezifität für verschiedene RXR-Heterodimere. Das Sequenzmotiv DR3 (HRE mit direkter Wiederholung des halben Konsensusmotivs im Abstand von 3 Nukleotiden) wird von VDR, das DR4-Motiv von TR und das DR5-Motiv von RAR bevorzugt (Umesono et al. 1991).

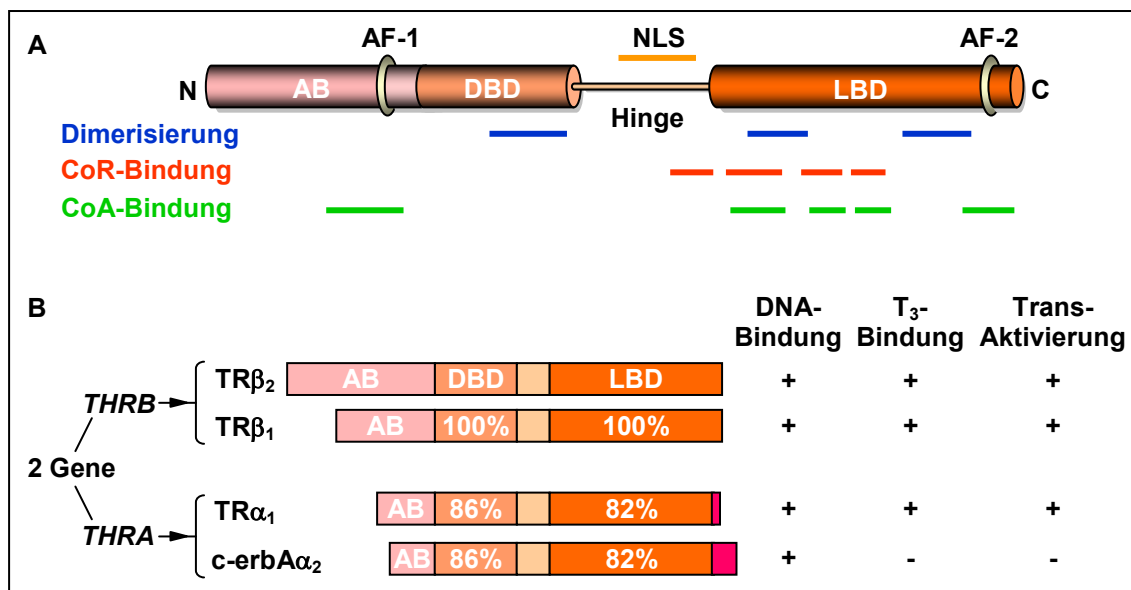
### 1.2.2 Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR)

Das Gen *THRA* auf Chromosom 17 codiert durch alternatives Spleißen die proteinogenen mRNAs von TR $\alpha_1$  und c-erbA $\alpha_2$  (*cellular homolog of the avian erythroblastosis virus*) (Mitsuhashi et al. 1988). Durch Nutzung alternativer Promotoren werden von *THRB* auf Chromosom 3 die Isoformen TR $\beta_1$  und TR $\beta_2$  als reife Proteine



## EINLEITUNG

exprimiert (Wood et al. 1996). Von diesen am häufigsten auf Proteinebene exprimierten Isotypen und Isoformen sind  $TR\alpha_1$  und  $TR\beta_1$  die Hauptformen und am besten charakterisiert (Abb. 3B).  $TR\alpha_1$  und  $TR\beta_1$  binden  $T_3$  mit ähnlicher Affinität ( $K_d$   $10^{-9} - 10^{-10}$  M) und sind transaktivierend (Munoz et al. 1988; Schwartz et al. 1992). Die Expression der Gene *THRA* und *THRB* wird Entwicklungs- und Gewebe-spezifisch differenziell reguliert. Zwar variiert die Expressionsstärke von  $TR\alpha_1$  in verschiedenen Geweben doch erfolgt die Expression ubiquitär.  $TR\alpha_1$  ist mit einem Anteil an der Gesamtexpression der TR von ca. 70 % der prädominante TR im Herz und gilt daher als Hauptmediator der positiv chronotropen und inotropen Effekte von  $T_3$  (Schwartz et al. 1992). Auch im Skelettmuskel, Knochen, Hirn, Innenohr und braunen Fettgewebe wird  $TR\alpha_1$  relativ stark exprimiert (Shao et al. 2006). Im Vergleich zu  $TR\alpha_1$  ist die Expression von  $TR\beta_1$  etwas stärker auf bestimmte Gewebe und Strukturen beschränkt.  $TR\beta_1$  ist mit ca. 80 % aller TR der Hauptvertreter in der Leber (Schwartz et al. 1992) und wird auch in der Hypophyse, im Innenohr, in der Retina und verschiedenen Hirnarealen sowie in der Niere relativ stark exprimiert (Forrest und Vennström 2000).



**Abb. 3: Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR)**

(A) Modularer Aufbau von Schilddrüsenhormonrezeptoren des Menschen. TR besitzen eine N-terminale Domäne mit der Liganden-unabhängigen Aktivierungsfunktion-1 (AF-1), eine zentrale DNA-Bindungsdomäne (DBD), eine flexible Scharnierdomäne (Hinge), die ein NLS trägt und eine C-terminale Ligandenbindungsdomäne (LBD) mit der Aktivierungsfunktion-2 (AF-2). In Blau werden für die Dimerisierung wichtige Bereiche dargestellt, rote Linien zeigen Corepressor-Interaktionsstellen an und grüne Linien weisen auf Schnittstellen der Coaktivator Interaktion hin. (B) Die beiden Gene *THRA* und *THRB* codieren verschiedene TR-Isotypen und -formen, von denen die vier am besten charakterisierten Produkte hier dargestellt sind.  $TR\beta_1$  unterscheidet sich durch eine verkürzte AB-Domäne von  $TR\beta_2$ . Die Prozentangaben stellen die Sequenzhomologien von DBD und LBD zur entsprechenden Domäne von  $TR\beta_2$  dar. Im Gegensatz zu den anderen dargestellten TR vermag  $c\text{-erbA}\alpha_2$  weder  $T_3$  zu binden, noch zu transaktivieren. Aus diesem Grund wird  $c\text{-erbA}\alpha_2$  zumeist auch nicht als  $TR\alpha_2$  bezeichnet.

Durch TR $\beta_1$  werden Cholesterin-senkende T<sub>3</sub>-Effekte und in Kooperation mit TR $\beta_2$  die TSH-Suppression in den thyreotropen Zellen der Adenohypophyse vermittelt (Gullberg et al. 2000; Gullberg et al. 2002; Forrest und Vennström 2000; Dupre et al. 2004). TR $\beta_2$  kann ebenfalls T<sub>3</sub> binden und wirkt transaktivierend (Hodin et al. 1989). Die Expression von TR $\beta_2$  ist überwiegend auf den Hypophysenvorderlappen und den Hypothalamus sowie auf das sich entwickelnde Innenohr und den Hippocampus beschränkt (Hodin et al. 1990; Bradley et al. 1992; Cook et al. 1992; Oetting und Yen 2007). Das zweite Hauptprodukt von *THRA*, TR $\alpha_2$  oder c-erbA $\alpha_2$ , wird hauptsächlich in der Hypophyse exprimiert und da es weder T<sub>3</sub> binden noch transaktivieren kann, wird die Bezeichnung c-erbA $\alpha_2$  bevorzugt (Abb. 3B). Vermutlich wirkt c-erbA $\alpha_2$  durch Konkurrenz um die DNA-Bindung als endogener dominant negativer Inhibitor der T<sub>3</sub>-Wirkung. Eine Reihe weiterer alternativer Spleißprodukte des *THRA* sind beschrieben (Lazar 1993; Wrutniak et al. 1995; Chassande et al. 1997; Flamant und Samarut 2003), ihre physiologische Bedeutung ist jedoch weitgehend unklar. Ungeachtet der Kenntnis um die differenzielle Expression der unterschiedlichen TR-Isotypen und -Isoformen konnten bisher keine Gen-spezifischen transkriptionellen Unterschiede zwischen den drei Hauptvertretern TR $\alpha_1$ , TR $\beta_1$  und TR $\beta_2$  festgestellt werden (Oetting und Yen 2007).

### 1.2.3 T<sub>3</sub>-responsive Elemente (TRE)

Durch ihre DBD (Abb. 3A) interagieren TR mit spezifischen DNA-Motiven, den T<sub>3</sub>-responsiven Elementen (TRE) in der Promotorregion der T<sub>3</sub>-Zielgene (Katz und König 1993; Harbers et al. 1996). Klassische TRE bestehen aus 2 sogenannten „half-sites“ mit der Kernsequenz AGGTCA die durch 4 Nukleotide voneinander getrennt sind (Harvey und Williams 2002). Es gibt jedoch eine Variabilität in der Kernsequenz, der Anordnung der half-sites, der Anzahl der half-sites und im Abstand zwischen den half-sites. Klassische TRE sind folgende Elemente: *direct repeat 4* (DR4 oder DR+4) AGGTCANNNNAGGTCA, *inverted palindrome 6* (IP6) TGACCTNNNNNNAGGTCA oder PAL (*palindrome*) AGGTCATGACCT (Yen 2001). Die Fähigkeit von TR, ein so großes Spektrum verschiedener Sequenzen zu binden, ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass TR als Monomer, als Homodimer oder als Heterodimer mit RXR zu binden vermögen (Glass 1994).

Detaillierte Bindungsstudien führten zu dem Schluss, dass die optimale Bindungsstelle eines TR $\alpha_1$  im Dimer die Sequenz TAAGGTCA darstellt und damit 5'-terminal um 2 Basenpaare länger als die bisher bekannte Konsensussequenz ist (Katz und König 1993). Eine einzelne solche Sequenz war in Reporterassays ebenso potent wie

das Wildtyp TRE des Ratten GH-Promotors. In einer nachfolgenden Arbeit wurde gezeigt, dass diese Sequenz hoch selektiv für TR ist und es deshalb erlauben würde, in Reporterassays die  $T_3$ -Induktion von den Einflüssen anderer NR zu isolieren (Katz und König 1994). Später zeigten Vennström und Mitarbeiter, dass auch die Nukleotide zwischen den half-sites einen Einfluss auf die TR-Bindung haben (Harbers et al. 1996). In dieser Studie waren TRE mit den Nukleotiden CTTC als Abstandhalter zwischen den half-sites am effektivsten für TR Homodimer- und TR/RXR Heterodimerbindung. Eine Verminderung der Bindung wurde beobachtet, wenn 3' der letzten half-site die Nukleotide GA enthalten sind (Quack et al. 2002).

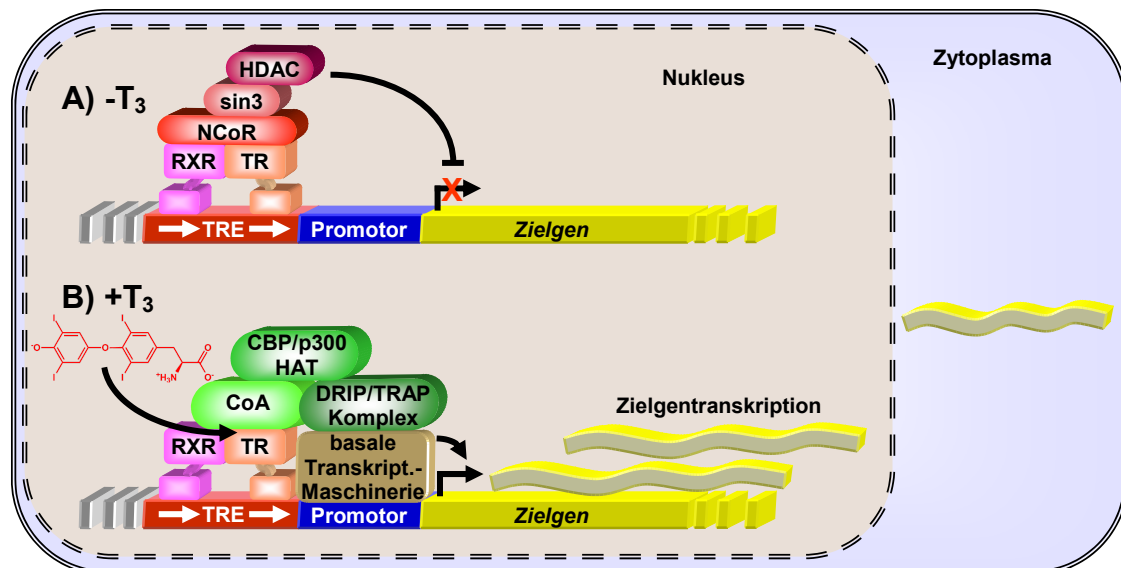
Im Promotor des Zellulären Retinsäure-bindenden Proteins 1 (CRABP-I) wurde ein negatives TRE mit der Sequenz TGACCTTTGGGGACCT beschrieben, welches die Reporteraktivität um mehr als 10-fach vermindert und TR $\beta$ -1 Monomere, Homodimere und Heterodimere mit RXR binden kann (Chang und Wei 1997).

### 1.2.4 Molekulare Wirkung von $T_3$

Die klassische molekulare Wirkung von  $T_3$  ist eine Aktivierung der Expression spezifischer Zielgene, die durch eine  $T_3$ -abhängige Interaktion von TR mit den Promotoren der Zielgene vermittelt wird. TR binden bereits in Abwesenheit von  $T_3$  als Aporezeptoren die TRE, rekrutieren CoR der Transkription (Heinzel et al. 1997; Horlein et al. 1995) und reprimieren die Transkription der Zielgene (Chen und Evans 1995; Baniahmad et al. 1992) (Abb. 4A). Die  $T_3$ -Bindung induziert allosterische Konformationsänderungen, sodass CoR dissoziieren, CoA binden und die Transkription aktiviert wird (Hu und Lazar 1999) (Abb. 4B). Der Korepressorkomplex besteht aus mehreren Proteinen und beinhaltet unter anderem N-CoR (*nuclear receptor corepressor*), SMRT (*silencing mediator for retinoid and thyroid receptors*) und Histon-Deacetylasen (HDAC) (Rosenfeld et al. 2006) (Abb. 4A). Essenziell für die transkriptionelle Repression durch ligandenfreie TR scheinen N-CoR und HDAC3 zu sein. HDAC3 wird durch die DAD (*deacetylase activating domain*) von N-CoR oder SMRT aktiviert (Guenther et al. 2001). Gemeinsam mit NCoR wird HDAC3 vom Aporezeptor zu den TRE rekrutiert und bewirkt durch lokale Histon-Deacetylierung die transiente Reprimierung der Zielgenaktivität (Ishizuka und Lazar 2003). Durch die Bindung von Agonisten faltet sich die C-terminale Helix 12 des TR in eine Position, die eine hydrophobe Spalte entstehen lässt (Wagner et al. 2001; Borngraeber et al. 2003; Nunes et al. 2004). Dadurch wird die Bindung von CoR verhindert (Feng et al. 1998; Ribeiro et al. 1998) und anstelle dessen interagieren CoA mit dem TR (Marimuthu et al. 2002). Strukturelle Untersuchungen führten zur „mouse trap hypothesis“, in der man

davon ausgeht, das H12 die Bindetasche der LBD nach Ligandenbindung wie ein Deckel verschließt und so die Bindung von CoA erlaubt (Bourguet et al. 1995; Darimont et al. 1998; Brzozowski et al. 1997). CoA induzieren die Transkription. Es gibt verschiedene Klassen von CoA mit unterschiedlichen Funktionen. Zum Beispiel besitzen CoA, wie CBP/p300 (*CREB-binding protein*) und Mitglieder der SRC/p160 Familie (z. B. SRC-1 (*steroid receptor coactivator 1*), PCAF (*p300/CBP-associated factor*), GRIP1/TIF2/NCoA2 (*GR interacting protein 1/transcriptional intermediary factor 2/nuclear receptor coactivator 2*), ACTR (*activator for thyroid hormones and retinoid receptor*)), Histon-Acetyltransferase-Aktivität (Nagy et al. 1999). In Ergänzung dazu vermittelt der DRIP (*vitamin-D-receptor-interacting protein*)-TRAP (*thyroid-hormon-receptor-associated protein*)-Komplex die Interaktion zwischen RNA Polymerase II (Pol II) und basalen TF (Bassett et al. 2003) (Abb. 4B). Neben Deacetylase- und Acetyltransferaseaktivität beinhalten die CoA/CoR-Multiproteinkomplexe auch weitere enzymatische Aktivitäten, wie Kinase-, Methylase-, Phosphatase-, Ubiquitinligase- und Chromatin-remodellierende Aktivitäten. Die Phosphorylierung von TR beeinflusst z. B. ihre Fähigkeit mit RXR zu heterodimersieren und ihre transkriptionelle Aktivität zu entfalten (Bhat et al. 1994).

TR können die Transkription einiger Zielgene, wie TSH  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheiten, auch negativ regulieren. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht genau bekannt (Yen 2006).



**Abb. 4: Modell zur Regulation der Zielgenexpression durch T<sub>3</sub>**

TR binden schon in Abwesenheit von T<sub>3</sub> die TRE ihrer Zielgene und rekrutieren dadurch Korepressoren (NCoR, HDAC, sin3) der Transkription. Wird T<sub>3</sub> von TR gebunden, führt dies nach allosterischer Konformationsänderung der Rezeptoren zu einem Austausch der Korepressoren gegen Koaktivatoren (grün: CoA, CBP/p300 HAT, DRIP/TRAP Komplex) und zu einer Interaktion mit der basalen Transkriptionsmaschinerie (braun). Dies führt zur Induktion der Zielgentranskription.

### 1.2.5 Physiologische Wirkungen von $T_3$ und $T_3$ -Zielgenen

$T_3$  beeinflusst die Genexpression in nahezu allen Geweben der Vertebraten (Bianco und Kim 2006). Zu den gut untersuchten  $T_3$ -Zielgenen gehören Gene, die an Entwicklung, Wachstum, Herzregulation und an metabolischen Prozessen, wie der Regulation des Intermediärstoffwechsels und der Thermogenese, beteiligt sind. Von einer Vielzahl an Genen, deren Expression nachweislich von  $T_3$  beeinflusst wird, ist jedoch noch kein detailliertes Wissen über den Mechanismus der Regulation durch  $T_3$  bekannt. Es ist beispielsweise für viele Gene noch unbekannt, ob die  $T_3$ -abhängige Genregulation direkt durch eine klassische Interaktion von TR und TRE oder indirekt durch Wechselwirkung mit intermediären Faktoren oder Genen erfolgt.

Zu den  $T_3$ -regulierten physiologischen Prozessen gehören einige, die das Wachstum und Entwicklung betreffen (Abb. 5A). Die  $T_3$ -induzierte Stimulation der hypophysären Wachstumshormon (GH)-Synthese fördert generelles Wachstum (Giustina und Wehrenberg 1995; Kamegai et al. 2001). Für den Knochenstoffwechsel in der Wachstumsphase nimmt  $T_3$  eine entscheidende Rolle ein (Harvey et al. 2002; Bassett und Williams 2003). Durch Regulation der endochondralen Ossifikation an den Epiphysenfugen nimmt  $T_3$  Einfluss auf das longitudinale Knochenwachstum (Shao et al. 2006). Deshalb kann eine Hypothyreose während der Wachstumsphase zu verschiedenen Beeinträchtigungen des Skelettwachstums, wie einer verzögerten Knochenreifeung, einer reduzierten Größe der Epiphysenfugen, einer Disorganisation des Knorpelanteils in den Epiphysenfugen sowie einer Beeinträchtigung der Differenzierung von Chondrozyten, führen (Bassett et al. 2006). Dies kann sich in Kombination mit anderen Mechanismen, z. B. einer Beeinflussung der GH-Regulation, in einem starken Minderwuchs äußern, wie er sich im klinischen Bild des Kretinismus manifestiert. Bei adulten Vertebraten übt  $T_3$  durch Aktivierung von Osteoklasten und Osteoblasten einen stimulierenden Einfluss auf den Knochenumsatz aus und beeinflusst dadurch direkt die Knochenmasse und Knochenstabilität. Zu den direkt oder indirekt durch  $T_3$  regulierten Genen, die für die Effekte auf den Knochenstoffwechsel verantwortlich sind, gehören die Gene von Kollagen Typ X (Böhme et al. 1992), Alkalischer Phosphatase (Miura et al. 2002), Aggrecanase-2 (Makihira et al. 2003) und der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR2) (Stevens et al. 2003; Barnard et al. 2005). FGFR1 ist ein  $T_3$ -Zielgen, für das eine direkte Regulation durch ein TRE beschrieben wurde (O'Shea et al. 2007). Auch die Expression von Heparansulfat-Proteoglykanen der Epiphysenfugen wird durch  $T_3$  induziert (Audhya et al. 1976; Bassett et al. 2006).  $T_3$  verstärkt die Aktivität der Alkalischen Phosphatase im Knochen und führt im Rahmen der  $T_3$ -induzierten

terminalen Differenzierung zur Hypertrophie der Chondrozyten (Burch und Lebovitz 1982; Burch und Van Wyk 1987).

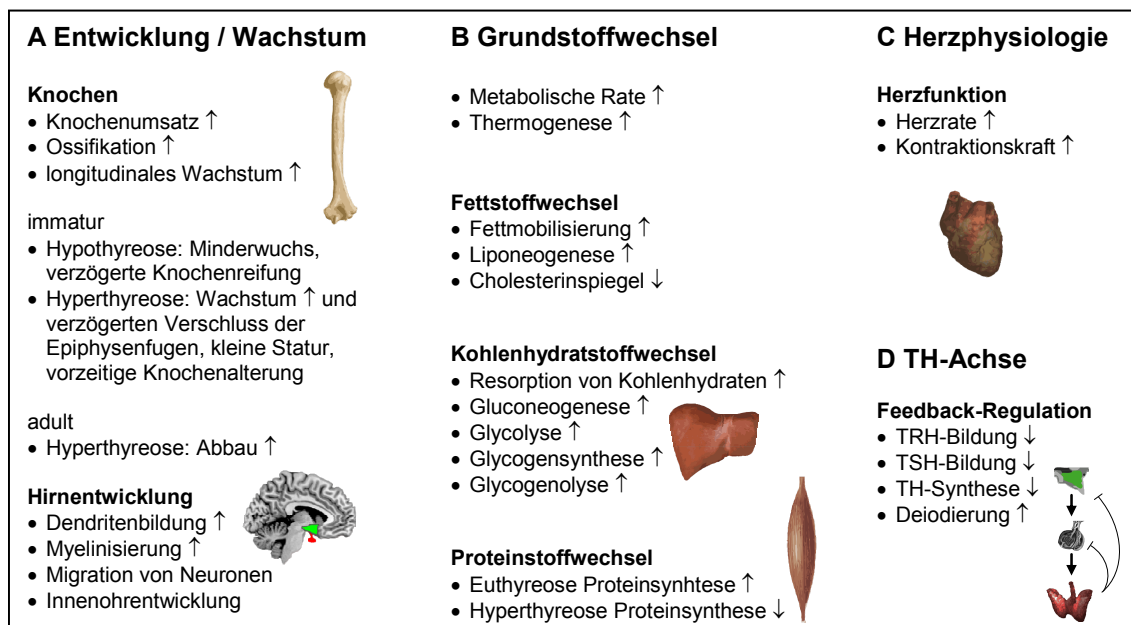
Für eine normale Entwicklung des Gehirns spielt  $T_3$  eine wichtige Rolle (Howdeshell 2002). Ein  $T_3$ -Mangel während der fetalen Gehirn-Entwicklung führt zu schweren permanenten Schäden und mentaler Retardierung, die sich im klinischen Bild des „Kretinismus“ äußern können (Nunez 1984; Porterfield und Hendry 1998). Unterstützt wird die Hirnentwicklung durch  $T_3$ , indem es die Dendritenbildung und Myelinisierung fördert (Abb. 5A). Im Hirn gelten die Gene des BTEB (*basic transcription element-binding protein*) (Morita et al. 2003), des *hairless corepressor* (Thompson 1996) und von Neurogranin (Guadano-Ferraz et al. 1997) als gesicherte  $T_3$ -Zielgene (Flamant et al. 2006). Die Entwicklung des Innenohrs wird entscheidend von  $T_3$  beeinflusst, sodass es bei einer kongenitalen Hypothyreose zu einem Hörverlust kommen kann (Howdeshell 2002).

$T_3$  nimmt auch Einfluss auf zahlreiche Stoffwechselprozesse (Abb. 5B). Den Fettstoffwechsel beeinflusst es z. B. durch eine gesteigerte Fettmobilisierung aus Speicherfetten. Auf die Liponeogenese wirkt  $T_3$  durch Induktion der Gene des Malatenzyms, der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase, der Fettsäuresynthase und von Spot14 stimulierend (Klein und Ojamaa 2001). Die Cholesterin-Werte werden durch Regulation von Apolipoprotein A-I (ApoA1) und Cholesterin-7 $\alpha$ -Hydroxylase (Cyp7) von  $T_3$  gesenkt. Eine Senkung von *low-density lipoprotein-cholesterin* (LDL-C) wird durch Induktion von hepatischen LDL-Rezeptoren vermittelt (Ness et al. 1998). Außerdem wird der Kohlenhydratstoffwechsel auf verschiedenen Ebenen durch  $T_3$  beeinflusst.  $T_3$  beschleunigt die intestinale Resorption von Kohlenhydraten, steigert die Glykoneogenese und die Glycolyse sowie die Glycogensynthese und die Glycogenolyse. Einige Gene der Glycolyse und Glykoneogenese werden durch  $T_3$  reguliert, so z. B. das der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK). Die Expression des hormonsensitiven Glucosetransporters GLUT-4 wird durch  $T_3$  im Skelettmuskel und Fettgewebe induziert (Casla et al. 1990). Schilddrüsenhormone können der Entwicklung einer Adipositas entgegenwirken, indem sie den Grundumsatz erhöhen (Lanni et al. 2001). Schilddrüsenhormone sind auch an der Regulation des Proteinstoffwechsels beteiligt. So hat  $T_3$  unter euthyreoten Bedingungen einen anabolen Effekt auf den Eiweißstoffwechsel, wohingegen unter Hyperthyreose eine katabole Wirkung vorherrscht. Den Stoffwechsel beeinflusst  $T_3$  beispielsweise auch durch eine verstärkte Expression des mitochondrialen Entkopplungsproteins UCP1 (*uncoupling protein 1*), was zur Thermogenese im braunen Fettgewebe führt (de Lange et al. 2001). Ebenso werden andere Entkopplungsproteine, wie UCP2 und UCP3 durch  $T_3$  transkriptionell reguliert, und scheinen mitverantwortlich für eine gesteigerte

metabolischen Rate im Skelettmuskel und Fettgewebe nach  $T_3$ -Gabe zu sein (Lanni et al. 2003). Außerdem führt die  $T_3$ -vermittelte Expression von Genen der  $Na^+/K^+$ -ATPase zu einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch der Gewebe und zur Thermogenese (Yalcin et al. 1999).

Einige Gene, die wichtige Elemente der TH-Achse, wie DIO1, DIO2, DIO3, TPO und Tg, codieren, stellen im Rahmen der Feedback-Regulation weitere wichtige Zielgene der Schilddrüsenhormone dar (König 2005) (Abb. 5D). In der Leber regulieren  $TR\alpha_1$  und  $TR\beta_1$  nach einer  $T_3$ -Stimulation dieselben Gene in Abhängigkeit ihres Expressionsniveaus (Yen et al. 2003).

Auch auf das Myokard hat  $T_3$  physiologische Effekte; es wirkt positiv chronotrop und positiv inotrop (Abb. 5C). Dies wird zum großen Teil über eine Steigerung der Expression von  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren bewirkt, wodurch eine Amplifikation von Katecholamin-Effekten auftritt. Außerdem wird die Expression des kardialen Schrittmacherproteins HCN2 (*hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2*) induziert (Trost et al. 2000). Zu weiteren positiv regulierten Zielgenen im Herzen gehören die der sarkoendoplasmatisches Retikulum- $Ca^{2+}$ -ATPase (SERCA), die der  $Na^+/K^+$ -ATPase und der Kaliumkanäle Kv1.5, Kv4.2 und Kv4.3. Unter den kardialen negativ regulierten  $T_3$ -Zielgenen befinden sich die Gene von  $TR\alpha_1$ , Myosin Schwere Kette (MHC)- $\beta$ , Phospholamban sowie Adenylatcyclase Typ V und VI (Klein und Ojamaa 2001).



**Abb. 5: Physiologische Wirkung von  $T_3$**

$T_3$  beeinflusst zahlreiche physiologische Prozesse aus den Kategorien Entwicklung/Wachstum (A) und Grundstoffwechsel (B). Auch für die Herzphysiologie (C) nimmt  $T_3$  eine wichtige regulierende Stellung ein. Außerdem beeinflusst es einige Endpunkte der TH-Achse (D). Details sind dem Text zu entnehmen.

T<sub>3</sub> bewirkt eine Verschiebung der Isoform-Balance von Herz- und Skelettmuskel MHC- $\beta$  zu MHC- $\alpha$  (Yen 2001; van Rooij et al. 2007). Zudem wirkt T<sub>3</sub> gefäßerweiternd auf periphere Blutgefäße.

Die T<sub>3</sub>-abhängigen Effekte auf die Herzmuskulatur und den Stoffwechsel werden vorwiegend von TR $\alpha_1$  vermittelt. Dagegen wird die Cholesterin-senkende Wirkung hauptsächlich durch TR $\beta_1$  eingeleitet. Daher lassen sich mit TR $\beta$ -spezifische Liganden Steigerungen der metabolischen Rate ohne den Nebeneffekt der Tachykardie erzielen. Dies macht  $\beta$ -selektive TR-Liganden interessant als potenzielle Therapeutika zur Behandlung des metabolischen Syndroms (Grover et al. 2003).

Durch Microarray-Analysen wurde in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer putativer Kandidaten für T<sub>3</sub>-regulierte Zielgene identifiziert (Feng et al. 2000; Miller et al. 2001; Weitzel et al. 2001b; Flores-Morales et al. 2002; Yen et al. 2003; Miller et al. 2004; Weitzel et al. 2003). In Zeitverlaufsexperimenten zeigten einige Zielgene eine biphasische T<sub>3</sub>-Responsivität (Weitzel et al. 2001b; Weitzel et al. 2003). Relativ viele der neu identifizierten Zielgene wurden durch T<sub>3</sub> negativ in ihrer Aktivität beeinflusst, jedoch konnte für die meisten Gene durch bioinformatische Methoden keine Konsensus-TRE entdeckt werden. Daher muss hier durch Identifizierung der TRE mittels Deletionsanalysen und *in vitro* Bindungsstudien, wie Elektrophorese-Retardationsanalysen (*electrophoretic mobility shift assay* EMSA) oder Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) nachgewiesen werden, dass es sich um direkte T<sub>3</sub>- und TR-abhängige Gene handelt (Flamant et al. 2006). Neuere Untersuchungen zeigten, dass einige der durch Microarray-Analysen identifizierten Zielgene vermutlich indirekt durch intermediäre Gene reguliert werden (Oetting und Yen 2007).

### 1.3 Reporterassays

Reporterassays dienen zur mechanistischen Untersuchung der Expression von Genen. Sie werden besonders zur Charakterisierung von genregulatorischen DNA-Sequenzen und -Sekundärstrukturen, wie Promotoren, Enhancer, Silencer und DNA-Haarnadelstrukturen sowie von TF und Co-Regulatoren der Transkription, verwendet. Man macht sich dabei sogenannte Reportergene – das sind Gene, deren Genprodukte sich durch spezifische Methoden leicht und zuverlässig nachweisen lassen – zunutze. Durch die Bestimmung der relativen Expression des Reportergens lassen sich Rückschlüsse auf die Funktionsweise und Aktivität der genregulatorischen Sequenzen und Faktoren ziehen. Die Wahl des Reportergens ist unter anderem von der Art der Nachweistchnik abhängig. Die Gene von fluoreszierenden Proteinen (FP), wie dem klassischen Grün-Fluoreszierenden-Protein (GFP), werden meist zum mikroskopischen



Nachweis in Reporter-genassays mit Zellen genutzt (Deo und Daunert 2001). Gene von Enzymen, wie der  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) (Jain und Magrath 1991), der Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) (Nordeen et al. 1987) und von Luziferasen, werden auch häufig als Reportergene verwendet. Der Nachweis der Reporter-genexpression erfolgt dann durch entsprechende enzymatische Tests, die z. B. colorimetrisch, photometrisch, radiometrisch oder fluorimetrisch basiert sein können. Die Sensitivität der Nachweistechiken für verschiedene Reportergene ist recht unterschiedlich und hängt auch von der jeweiligen Anwendung ab. Lumineszenzreaktionen zeichnen sich durch eine hohe Sensitivität mit minimalem Hintergrund und einfache Durchführbarkeit aus, weshalb sie zurzeit weit verbreitet sind (New et al. 2003). Auch die Spezifität des Reporter-gennachweises ist, besonders bei enzymatischen Tests, von der jeweiligen Anwendung abhängig und trägt zur Wahl des am besten geeigneten Reportergens bei. So besitzen manche Zelllinien endogene Enzyme, die in einem gewissen Umfang ebenfalls die Nachweisreaktion des verwendeten Reporter-enzym katalysieren können. Bei Verwendung von FP kann es unter gewissen Versuchsbedingungen zu starker unspezifischer Auto- oder Hintergrundfluoreszenz der verwendeten Zellen kommen. Die Verwendung von Luziferasen in Reporter-genassays mit Säugerzellen bietet sich nicht nur wegen ihrer hohen Sensitivität –  $10^{-20}$  mol des Enzyms können detektiert werden, das ist 100x sensitiver als CAT Assays – an, sondern auch aufgrund ihrer hohen Spezifität, die in der Abwesenheit von endogenen Luziferasen sowie deren Substrate in den Versuchs-Organismen oder -Zellen begründet ist (Alam und Cook 1990; New et al. 2003).

### 1.3.1 T<sub>3</sub>-Reporter-genassays

Gegenüber *in vitro* Rezeptor-Bindungsassays kann ein Reporter-genassay zwischen Agonisten und Antagonisten unterscheiden (DeVito et al. 1999). Da T<sub>3</sub> über die TRE als cis-Elemente und die TR mit ihren Koregulatoren als trans-Elemente genregulatorisch wirkt, bietet sich ein Luziferase-Reporter-genassay zum Hochdurchsatz-Screening von potenziellen T<sub>3</sub>-Agonisten und -Antagonisten an. Dafür wird ein Reporter-genplasmid konstruiert, das ein oder mehrere TRE, gefolgt von einem heterologen Minimalpromotor und einem Luziferasegen trägt. Das Reporter-gen ist hierbei meist eine codon-optimierte Luziferasevariante des Leuchtkäfers *Photinus pyralis*. Die Methoden in Veröffentlichungen zu T<sub>3</sub>-Reporter-genassays unterscheiden sich durch vielfältige Parameter, wie genutzte Zelllinien, Art der TRE oder Promotoren, Kotransfektionen mit TR und/oder CoA sowie dem experimentellen Aufbau (Katz und

König 1993; Furlow und Brown 1999; Weitzel et al. 2001a; Yamada-Okabe et al. 2003; Kitamura et al. 2005; Jugan et al. 2007).

### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau eines robusten, reproduzierbaren und miniaturisierbaren *in vitro* Reporter genscreeningassays zur Analyse einer potenziellen T<sub>3</sub>-agonistischen oder -antagonistischen Wirkung von ausgewählten Testsubstanzen in Bezug auf die T<sub>3</sub>-TR-medierte Genexpression. Zu diesem Zweck wird zunächst ein sensitives Detektionssystem für die genomische T<sub>3</sub>-Wirkung benötigt. Hierfür müssen verschiedene Zellen, Vektoren, Promotoren und Reportergene verglichen werden. Darauf aufbauend wird sich eine Optimierung der Detektion und experimentellen Durchführung anhand bekannter synthetischer TR-Agonisten und -Antagonisten anschließen. Nach erfolgreicher Etablierung, Charakterisierung und Validierung des Assays werden Testsubstanzen aus unterschiedlichen Stoffgruppen bezüglich ihrer Wirkung auf die T<sub>3</sub>-TR-regulierte Genexpression analysiert und Dosis-Wirkungskurven in Tests auf T<sub>3</sub>-Agonismus bzw. -Kompetition aufgezeichnet. Die Auswahl der Testsubstanzen folgte den Empfehlungen eines internationalen, von der EU geförderten Verbundes verschiedener wissenschaftlicher Arbeitsgruppen zur Risikobewertung von Endokrinen Disruptoren (EURISKED - *Multi-organic Risk Assessment of Selected Endocrine Disruptors*) und von Kooperationsprojekten im Rahmen des übergeordneten Konsortiums CREDO (*Cluster for Research on Endocrine Disruption in Europe*). Stoffe aus den Gruppen der Industriechemikalien, Kosmetika und Nahrungsmittel mit entweder struktureller Verwandtschaft zu natürlichen Schilddrüsenhormonen oder einer humanrelevanten Exposition durch z. B. hohe und weiter steigende Produktionsvolumina und/oder Anreicherung in Umwelt, Nahrungskette oder humanem Gewebe (Bioakkumulation) werden der vergleichenden Analyse zugeführt. Die zu messenden Dosis-Wirkungskurven der Testsubstanzen sollen Aufschluss über den Konzentrationsbereich einer potenziellen Interferenz mit der TR-vermittelten Genexpression geben, sodass anhand der tatsächlichen Exposition durch Umwelt, Nahrung oder Kosmetik eine mögliche Gesundheitsgefährdung erkannt, eingeordnet und diskutiert werden kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die benötigten Chemikalien in *pro analysi*-Qualität von den hier aufgelisteten Firmen bezogen:

Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)  
Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)  
Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)  
VWR International (Hannover, Deutschland)  
Boehringer (Mannheim, Deutschland)  
Bio-Rad (München, Deutschland)  
Serva Feinbiochemika (Heidelberg, Deutschland)

### 2.2 Lösungen, Puffer und Supplemente

Die nicht gesondert aufgeführten Lösungen wurden nach dem Handbuch Molecular Cloning (Sambrook und Russel 2001) hergestellt. Für das Ansetzen von Lösungen wurde Reinstwasser verwendet, das mit der Anlage „EASYpure UV<sup>TM</sup>“ der Firma Barnstead International (Dubuque, Iowa, USA) hergestellt wurde. Im Folgenden wird dieses als H<sub>2</sub>O bidest. (Aqua bidestillata) bezeichnet.

Zum Sterilisieren wurden hitzestabile Lösungen autoklaviert (20 min bei 121°C und 2,0 bar) und hitzelabile Lösungen steril filtriert (Sterilfilter: 0,22 µm Porenweite, Millipore).

Zur Sterilitätskontrolle wurden Aliquots von jedem selbst hergestellten Zellkultur- und Versuchsmedium nach dem Sterilisieren mehrere Tage im Brutschrank inkubiert und dann mikroskopisch auf Kontaminationen untersucht.

### 2.3 Reaktionssysteme (Kits)

QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen® (Hilden, Deutschland)  
QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen® (Hilden, Deutschland)  
QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen® (Hilden, Deutschland)  
QIAfilter Plasmid Maxi Kit, Qiagen® (Hilden, Deutschland)  
QIAGEN Plasmid Giga Kit, Qiagen® (Hilden, Deutschland)  
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)  
Luciferase Assay System, Promega (Mannheim, Deutschland)  
Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega (Mannheim, Deutschland)

CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability Assay, Promega (Mannheim, Deutschland)  
Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7 Assay System, Promega (Mannheim, Deutschland)  
Cell Proliferation Kit I (MTT), Roche (Mannheim, Deutschland)

### 2.4 Enzyme

Alle nicht gesondert aufgeführten Enzyme (Restriktionsendonukleasen, Polymerasen, Ligasen, Kinasen, etc.) für Amplifizierungen, Klonierungen und Sequenzierungen wurden von New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) oder Promega (Mannheim, Deutschland) bezogen.

### 2.5 Nukleinsäuren

#### 2.5.1 Gekaufte bzw. geschenkte Plasmide

Tab. 1: Plasmide

Plasmid	Herkunft / Referenz
pEGFP-C1	Clontech (Heidelberg)
pGEM <sup>®</sup> -T Easy Vector	Promega (Mannheim)
pGL2-Basic Vector	Promega (Mannheim)
pGL3-Basic Vector	Promega (Mannheim)
pGL3-Promoter Vector	Promega (Mannheim)
phRL-TK	Promega (Mannheim)
pGL4.10[ <i>luc2</i> ] Vector	Promega (Mannheim)
pGL4.70[ <i>hRLuc</i> ] Vector	Promega (Mannheim)
pGL4.74[ <i>hRLuc</i> /TK] Vector	Promega (Mannheim)
pGLuc-Basic Vector	New England Biolabs(Frankfurt am Main)
pCMV-GLuc Control Plasmid	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
pRS-rTR $\alpha_1$	(Thompson et al. 1987; Thompson und Evans 1989)
pRS-hTR $\beta_1$	(Weinberger et al. 1986)
pcTR $\alpha_1$	(Sap et al. 1986)
prTR $\beta_1$	(Murray et al. 1988)
pBPLUGA	(Kollmus et al. 1996)
pBK-RSV	Stratagene (La Jolla, CA, USA)

### 2.5.2 Oligonukleotide

Primer und andere Oligonukleotide wurden bei MWG-Biotech (Ebersberg) bzw. Invitrogen (Karlsruhe) bezogen und als 100  $\mu\text{M}$  (= 100 pmol/ $\mu\text{L}$ ) Aliquots zu 50  $\mu\text{L}$  bei -20 °C aufbewahrt. Die Primer zur Konstruktion der Reporter-genplasmide waren mit einer 5'-terminale Sequenz zur BamH1-basierten Subklonierung versehen (gGATCC).

**Tab. 2: Oligonukleotide zur Konstruktion von Reporter-genplasmiden**

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')
F-posDR4a	GATCCTAAGGTCACCTTCAGGTCAGTG
R-posDR4a	GATCCAGTGACCTGAAGTGACCTTAG
F-posDR4b	GATCCAGCTGTAAGGTCACCTTCAGGTCACAGCTG
R-posDR4b	GATCCAGCTGTGACCTGAAGTGACCTTACAGCTG
F-negDR4a	GATCCTGACCTTTGGGGACCTG
R-negDR4a	GATCCAGGTCCCCAAAGGTCAG
F-negDR4b	GATCCAGCTGACCTTTGGGGACCTCAGCTG
R-negDR4b	GATCCAGCTGAGGTCCCCAAAGGTCAGCTG

**Tab. 3: Primer zur Sequenzierung**

Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' → 3')
FwdSeq-GL3	AGCCCAAGCTACCATGATAAG
RevPCR-GL3	CAATTAGTCAGCAACCATAGTC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
T17	TAATACGACTCACTATAGG
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG

### 2.5.3 DNA-Größenmarker

Folgende DNA-Größenmarker wurden von New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen und nach Herstellerangabe verwendet:

PCR Marker, 100 bp DNA Ladder, 1 kb DNA Ladder

## 2.6 Bakterienstämme

Tabelle 4 gibt Auskunft über die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme.

**Tab. 4: Bakterienstamm**

Stamm	Genotyp	Referenz
JM109	<i>endA1</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>hsdR17</i> ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ), <i>relA1</i> , <i>supE44</i> , $\Delta(lac-proAB)$ , [ $F'$ <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laql<sup>q</sup></i> $\Delta$ M15]	Promega (Mannheim)

## 2.7 Geräte

In Tabelle 5 sind die für diese Arbeit verwendeten Geräte aufgeführt.

**Tab. 5: Geräte**

Gerät	Bezeichnung	Bezugsquelle
Elektrophorese-Kammern	BlueMarine Horizontal Submarine Electrophoresis Unit	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg)
	MAXI Elektrophorese-Kammer	Carl Roth (Karlsruhe)
Geldokumentations system	Geldokumentationssystem	Vilber Lourmat Deutschland GmbH (Eberhardzell)
Heizblöcke	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Inkubationsschüttelschrank	3033	GFL (Burgwedel)
Inkubator	HERAcell	Heraus (Hanau)
Luminometer	Mithras LB 940	Berthold Technologies (Bad Wildbad)
Mikroskope	Axioskop 2 mit aufrechtes Forschungsmikroskop	Carl Zeiss (Oberkochen)
	Stereomikroskop SZ2	Olympus (Hamburg)
	Wilovert 30 Standard	Hund (Wetzlar)
pH-Meter	inoLab pH Level 1	WTW (Weilheim)
Pipetten	Pipetman <sup>®</sup> P2, P10, P20, P200, P1000, Distriman <sup>®</sup>	Gilson (Middleton, USA)
	Research 8-Kanal 30-300 $\mu$ l, Multipette <sup>®</sup> plus	Eppendorf (Hamburg)
Pipettierhilfen	accu-jet <sup>®</sup> pro	Brand (Wertheim)

## MATERIAL UND METHODEN

Plattenschüttler	DELFI A Plateshake	PerkinElmer LAS (Germany) GmbH (Rodgau – Jügesheim)
Reinstwasser- Anlage	EASYpure UV™	Barnstead International (Dubuque, Iowa, USA)
Universalschüttler	Swip SM 25	Edmund Bühler GmbH (Tübingen)
Photometer	NanoDrop® ND-1000	peqLab (Erlangen)
	Spectrophotometer U-2001	Hitachi High-Technologies Corporation (Finchampstead, Wokingham Berkshire, UK)
Schüttelwasserbad	Modell 1083	GFL (Burgwedel)
Sterilbank	HERAsafe® LaminAir HB2448	Heraus (Hanau)
Thermocycler	Primus 96plus	MWG Biotech (Ebersberg)
UV-Transilluminator	N90	Th. Geyer (Renningen)
Vakuumpumpe	LABOPORT® N840.3 FT.18 LABOPORT® N820.3 FT.18	KNF Neuberger GmbH (Freiburg)
Vakuumzentrifuge	Concentrator 5301	Eppendorf (Hamburg)
Vortex Gerät	Reax 2000 L46	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG (Schwabach)
Waagen	Laborwaage CP2201-OCE	Sartorius (Göttingen)
	Laborwaage CP323S-OCE	Sartorius (Göttingen)
	Ultramicro 4504MP8	Sartorius (Göttingen)
Zentrifugen	Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
	Zentrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg)
	Zentrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
	Megafuge 1.0R	Heraus (Hanau)
	Micro-Spin FV-2400	A. Hartenstein Laborbedarf GmbH (Würzburg)

### 2.8 Verbrauchsmaterial

**Tab. 6: Verbrauchsmaterial**

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
Deckgläser, rund, Ø 12 und 15 mm	Carl Roth (Karlsruhe)
Einmalspritzen	Carl Roth (Karlsruhe)
Einweghandschuhe, Rotiprotect	Carl Roth (Karlsruhe)
Hautdesinfektionsmittel, Dode Sterillium	Bode (Hamburg)
Objektträger, SuperFROST Plus	Carl Roth (Karlsruhe)
Papiertücher	Carl Roth (Karlsruhe)
Parafilm „M“	Carl Roth (Karlsruhe)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim)
Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg)
Sterilfilter, 0,22 µm Porenweite FP 30/0,2 CA-s	Schleicher & Schuell (Dassel)

### 2.9 Spezielle Software

- Reference Manager 11
- ISI Research Soft, Berkley CA, USA
- Beacon Designer 3.0
- Premier Biosoft, Palo Alto CA, USA
- Graphpad Prism 4.03
- Graphpad Software, San Diego CA, USA
- BioEdit, Version 7.0.5.2
- (Hall 1999)

### 2.10 Datenbanken

- PubMed
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>
- Blat Search
- <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>
- MatInspector
- <http://www.genomatix.de/products/MatInspector/>
- OMIM
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim>
- Primer3
- [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)
- ENSEMBL
- <http://www.ensembl.org/index.html>



### 2.11 Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken wie Bakterienaufzucht, Medienherstellung, Agarosegelelektrophorese, Restriktionsenzymverdau oder Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurden nach etablierten Protokollen durchgeführt, wie sie in dem Handbuch Molecular Cloning (Frisch, Sambrock, Maniatis) beschrieben sind.

#### 2.11.1 Isolation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte nach alkalischer Lyse über Adsorptionsaufreinigung unter Verwendung entsprechender Kits von Qiagen (Hilden) nach Herstellerangabe.

Hierzu wurde am Tag vor der Plasmid-Präparation ein vom Hersteller empfohlenes Volumen an LB-Medium inklusive 50 µg/mL Ampicillin bzw. 30 µg/mL Kanamycin als Selektionsantibiotikum mit Bakterien einer Glycerinkultur bzw. einer frischen Transformation angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Inkubationsschüttelschrank (220 rpm) inkubiert.

#### 2.11.2 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Zur Konzentrations-Bestimmung einer wässrigen Nukleinsäurelösung wurde die Extinktion der Lösung bei  $\lambda=260$  nm ( $E_{260}$ ), dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, mit einem Spektrophotometer gemessen. Als Referenzwert diente die  $E_{260}$  des Lösungsmittels ( $H_2O$  bidest.). Für die Nukleinsäurekonzentration gilt:

Eine  $E_{260}$  von 1 entspricht:

$$\begin{aligned} & 50 \text{ µg/mL für doppelsträngige DNA,} \\ & 40 \text{ µg/mL für einzelsträngige DNA oder RNA,} \\ & 20 \text{ µg/mL für einzelsträngige Oligonukleotide} \end{aligned} \quad (1)$$

Demzufolge gilt für die Konzentration einer verdünnten Nukleinsäurelösung:

$$c \left[ \frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right] = \frac{E_{260} \cdot x \cdot \text{Verdünnungsfaktor}}{1000} \quad \left( \begin{array}{l} x = 50 \text{ für dsDNA} \\ x = 40 \text{ für ssDNA oder RNA} \\ x = 20 \text{ für einzelsträngige Oligonucleotide} \end{array} \right) \quad (2)$$

Um den Verunreinigungsgrad einer DNA-Lösung mit Proteinen zu bestimmen, wurde die Extinktion bei  $\lambda=280$  nm ( $E_{280}$ ), dem Absorptionsmaximum von aromatischen Aminosäuren (Phe, Trp, Tyr), gemessen. Der Quotient  $E_{260}/E_{280}$  gilt als Maß für die Reinheit der DNA-Lösung:

reine DNA-Lösung:  $\frac{E_{260}}{E_{280}} = 1,8$

und

(3)

reine RNA-Lösung:  $\frac{E_{260}}{E_{280}} = 2,0$

Quotienten niedriger als 1,8 deuten auf eine Verunreinigung der DNA-Lösung mit Proteinen hin, während höhere Werte auf eine Verunreinigung mit RNA oder einzelsträngiger DNA hinweisen.

### 2.11.3 Fällen von DNA

Um Nukleinsäuren einer wässrigen Lösung aufzureinigen und zu konzentrieren, führt man eine Fällung durch. Dabei wird den Nukleinsäuren die Hydrathülle durch Zugabe von Salzen und organischen Lösungsmitteln entzogen, wodurch sie wasserunlöslich werden und präzipitieren. Überschüssige Salze und Nukleotide bleiben gelöst und können nach Zentrifugation als Bestandteile des Überstandes entfernt werden.

### 2.11.4 Ethanolische Fällung von DNA

Bei der ethanolischen Fällung von DNA wurde wie folgt vorgegangen:

- 1 Vol. DNA in wässriger Lösung mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat pH 5,2 versetzen
- 2,5 Vol. EtOH abs. (4 °C) hinzugeben
- ggf. 1 µL yeast tRNA (2,5 µg/µL) zur Verbesserung der Präzipitation, kurz vortexen
- für 15 - 30 min oder über Nacht (ü. N.) bei 4 °C inkubieren
- für 30 min bei 4 °C und 20000 g zentrifugieren, den ÜS verwerfen
- DNA-Pellet in 0,1 mL Ethanol (70 %) waschen
- für 5 min bei 4 °C und 20000 g zentrifugieren, den ÜS verwerfen
- das Pellet ca. 10 min an der Luft trocknen
- Pellet in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O bidest. resuspendieren, so dass sich die gewünschte DNA-Konzentration ergibt

### 2.11.5 DNA-Fällung mit Isopropanol

Bei der Fällung mit Isopropanol wurde nach folgendem Protokoll gearbeitet:

- 1 Vol. DNA in wässriger Lösung mit 0,1 Vol. 3 M Na-Acetat pH 5,2 versetzen
- 0,7 Vol. Isopropanol zugeben
- mischen (kurz vortexen) und für 5-10 min bei Raumtemperatur inkubieren
- für 30 min bei 4 °C und 20000 g zentrifugieren, den ÜS verwerfen
- DNA-Pellet in 0,1-1 mL EtOH (70 %) waschen
- für 5 min bei 4 °C und 20000 g zentrifugieren, den ÜS verwerfen

- das DNA-Pellet ca. 10 min an der Luft trocknen
- Pellet in einem geeigneten Volumen H<sub>2</sub>O bidest. resuspendieren, so dass sich die gewünschte DNA-Konzentration ergibt

### 2.11.6 Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen und Enzymen aus Nukleinsäurelösungen wurde eine Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1 v/v/v) Extraktion vorgenommen. Im Anschluss erfolgte eine ethanolische Fällung. Das Basisprotokoll war folgendes:

- Nukleinsäurelösung und Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1 (Roth, Karlsruhe) im Verhältnis 1:1 mischen
- vortexen
- für 1 Minute bei 20000 g zentrifugieren
- wässrige obere Phase mit Nukleinsäuren in ein neues Gefäß überführen
- über eine Ethanol- oder Isopropanol-Fällung reinigen und konzentrieren

### 2.11.7 Lagerung von DNA

Die Lagerung von präparierter DNA erfolgte bei -20 °C in wässriger Lösung zu 20 µL-Aliquots. Zum Gebrauch wurde jeweils nur ein Aliquot aufgetaut, um Schädigungen durch den Auftau-Einfrier-Zyklus zu verhindern. In gleicher Weise wurde mit DNA-Markern und Oligonukleotiden verfahren.

### 2.11.8 Restriktion von DNA

DNA kann mithilfe von bestimmten Enzymen, den Restriktionsendonukleasen, an spezifischen Stellen durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung geschnitten werden. *In vivo* stellen Restriktionsendonukleasen zusammen mit DNA-Methylasen ein bakterielles Schutzsystem gegen integrierte Fremd-DNA dar. Organismuseigene DNA ist bei Prokaryoten an Adenin methyliert (bei Eukaryoten an C) und dadurch vor den Restriktionsendonukleasen geschützt, wohingegen inserierte Fremd-DNA unmethyliert ist und daher geschnitten und abgebaut wird. Die Schnittstellen jedes Enzyms werden durch ihre relative Position zu enzymspezifischen Erkennungssequenzen festgelegt. Man unterscheidet drei Typen von Restriktionsendonukleasen (Typ I, II, III), die sich unter anderem durch die Art der Erkennungsstellen, relative Position von Erkennungs- und Schnittstelle zueinander und Auftreten von Methylase und Endonuklease als eigenständige Enzyme oder als Domänen eines Enzyms unterscheiden. Molekularbiologisch werden v. a. Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet. Diese schneiden DNA innerhalb der kurzen, oft palindromischen Erkennungssequenz

von 4-8 bp. Die dabei gebildeten DNA-Fragmente können glatte („blunt ends“) oder überhängende („sticky ends“) Enden aufweisen (Roberts et al. 2003).

Die Restriktionsendonukleasen wurden mit den zugehörigen Puffern nach Herstellerempfehlung im Verhältnis von 2-5 Units Enzym pro 1 µg DNA eingesetzt:

**1x Ansatz für ein Enzym**

2-5 µg DNA-Lösung  
2 µL 10x Puffer  
1 µL Enzym (10 U/µL)  

---

ad 20 µL H<sub>2</sub>O

**1x Ansatz für zwei Enzyme**

2-5 µg DNA-Lösung  
2 µL kompatibler 10x Puffer  
1 µL Enzym a (10 U/µL)  
1 µL Enzym b (10 U/µL)  

---

ad 20 µL H<sub>2</sub>O

für 1,5 h bei 37 °C inkubieren

### 2.11.9 Gelelektrophorese von DNA

Um Gemische unterschiedlich großer DNA-Fragmente ihrer Molekülgröße nach aufzutrennen, bedient man sich der Gelelektrophorese. Bei diesem Verfahren dient ein in Laufpuffer befindliches Gel (Agarose- oder PAA-Gel) als ungeladene, poröse Matrix, durch die sich DNA-Moleküle nach Anlegen einer elektrischen Spannung aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen in Richtung Anode bewegen. Das Gel setzt der Molekülbewegung einen Widerstand entgegen. Dieser Widerstand ist proportional zur Molekülgröße, sodass sich Laufgeschwindigkeit und Molekülgröße bei konstanter Spannung und Geldicke umgekehrt proportional zueinander verhalten. Dies hat eine Auftrennung der Moleküle nach ihrer Größe zur Folge; die Gelmatrix wirkt als „Molekularsieb“. Neben der Molekülgröße bestimmt die Molekül-Konfiguration, die Nettoladung, die elektrische Feldstärke und die Porengröße der Gelmatrix das Wanderungsverhalten der Moleküle. Die Porengröße des Gels wird durch Konzentration der Matrixsubstanz bestimmt. Mit steigender Konzentration der Matrixsubstanz nimmt die Porengröße ab.

Zur Bestimmung der Fragmentgrößen wird in einer parallelen Spur zur Probe ein Größenmarker aufgetrennt. Dieser Marker stellt ein Gemisch aus Molekülen bekannter Größe dar. Nach Abklemmen der elektrischen Spannung kann durch Vergleich der Laufdistanz von Proben-Fragmenten unbekannter Molekülgröße und Marker-Fragmenten bekannter Größe auf die Größe der Probefragmente geschlossen werden. Hierfür werden die DNA-Fragmente mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Ethidiumbromid ist ein dsDNA-interkalierender Stoff, der bei Bestrahlung mit UV-Licht fluoresziert.

Folgendes Protokoll lag den DNA-Gelelektrophoresen zugrunde:

- die DNA-Proben mit 6x DNA-Probenpuffer versetzen
- Agaroselösung in Tris-Acetat-EDTA (TAE) Puffer lösen und aufkochen
- auf ca. 40-45 °C abkühlen lassen
- Ethidiumbromid (10 mg/mL Stammlsg.) auf 0,1 µg/mL Endkonzentration hinzugeben
- Agaroselösung in einen mit einem Gelkamm bestückten Gelträger gießen
- nachdem das Gel ausgehärtet ist, das Gel in eine horizontale Gel-Laufkammer einsetzen, mit dem Laufpuffer (0,5x TAE) überschichten und den Kamm entfernen
- die Geltaschen luftblasenfrei spülen
- das Gel mit den DNA-Proben und Markern beladen
- die Elektrophorese für 10 min bei 80 V beginnen
- dann bei 120 V laufen lassen, bis der gewünschte Trenneffekt erreicht ist
- Gel am UV-Transiluminator betrachten, auswerten und dokumentieren

### 2.11.10 PCR

Bei der PCR handelt es sich um eine Methode zur Amplifikation von DNA-Abschnitten auf enzymatischem Wege. Vervielfältigt werden dabei DNA-Bereiche, die von spezifischen Primern begrenzt werden. Durch eine geeignete Wahl von Primern kann deshalb auch die Produktlänge bestimmt werden.

Im ersten Schritt eines PCR-Zyklus werden doppelsträngige DNA-Matrizen durch Hitzebehandlung (bei 93 – 95 °C) denaturiert, sodass Einzelstränge entstehen. Es folgt die Hybridisierung der Primer mit den einzelsträngigen Matrizen (primer annealing) bei einer Temperatur, die ca. 5 °C unter der theoretischen Schmelztemperatur  $T_m$  der Primer liegt (meist bei 50 – 70 °C). Im Anschluss daran katalysiert die verwendete Polymerase von den Primern aus unter Einbau der dNTPs die Synthese der zu den Matrizen komplementären Zweit-DNA-Stränge (Elongation, üblicherweise bei 70 bis 75 °C). Aus diesem Schritt resultieren doppelsträngige DNA-Moleküle und der erste Zyklus ist beendet. Es können nun weitere Zyklen folgen (meist ca. 30), innerhalb derer die Matrizen-DNA, wie auch im Zyklus 1, jeweils verdoppelt wird, sodass eine exponentielle Amplifikation der Matrizen-DNA erreicht wird.

Zur Berechnung der theoretischen Schmelztemperatur für Oligonukleotide mit Längen von weniger als 25 Basen gilt folgende Näherungs-Regel (Wallace Regel) (Suggs et al. 1981; Wallace et al. 1981).

$$T_m [^{\circ}\text{C}] = 4 \cdot (\sum C + \sum G) + 2 \cdot (\sum A + \sum T) \quad (4)$$

Um optimale Ergebnisse in Bezug auf Produktausbeute und -spezifität zu erlangen, können alle Parameter einer PCR für die jeweilige Reaktion optimiert werden.

### 2.11.11 Colony PCR

Diese Methode dient der schnellen Untersuchung von Bakterienkolonien auf das Vorhandensein bestimmter Plasmide im Rahmen von Klonierungen. Die Bakterien einer ausgewählten Kolonie werden durch Erhitzen lysiert und von dem Lysat erfolgt im Anschluss ohne weitere Aufreinigung direkt eine analytische PCR.

- 100 µL steriles Wasser in Reaktionsgefäßen vorlegen
- ausgewählte Kolonien auf der Nährbodenplatte markieren
- einen Teil dieser Kolonien mit einer Pipettenspitze in das vorgelegte Wasser übertragen
- Lyse der Bakterien durch Inkubation bei 95 °C für 5 Minuten
- 1 µL des Lysats zur PCR einsetzen, das PCR Programm durchführen und auswerten

#### 1x Ansatz

2 µL PCR Puffer (10x)

2 µL 10x dNTPs (2 mM)

14 µL H<sub>2</sub>O

1 µL Template

0,4 µL Primer 1 (100 µM)

0,4 µL Primer 2 (100 µM)

0,2 µL DNA-Polymerase (5 U/µL)

### 2.11.12 DNA-Sequenzierung

Für die Sequenzierung von Plasmiden wurden Sequenzierreaktionen mit dem BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) nach Herstellerangabe durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte in der Pädiatrischen Endokrinologie der Charité (Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Grüters-Kieslich).

### 2.11.13 Hybridisieren von Oligonukleotiden

Zur Hybridisierung von einzelsträngigen Oligonukleotiden wurden die Lösungen von je 2 Oligonukleotidspezies im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach Erwärmung auf 95 °C für 1 Minute erfolgte eine Abkühlung der Mischung auf RT für 10 Minuten und dann eine Inkubation auf Eis für weitere 10 Minuten.

- 20 µL Oligonukleotid A (100 µM)
- 20 µL Oligonukleotid B (100 µM)
- 1 Minute bei 95 °C inkubieren
- 10 Minuten bei RT inkubieren
- 10 Minuten bei 4 °C inkubieren

### 2.11.14 Phosphorylierung von Oligonukleotiden

Zur Phosphorylierung von Oligonukleotiden wurde das Enzym T4 Polynukleotid Kinase (PNK) der Firma NEB nach Empfehlung des Herstellers verwendet. Für bestimmte Reaktionen musste das Standardprotokoll optimiert werden:

Phosphorylierung von Oligonukleotiden

- 3 µL Oligonukleotid-Lösung (0,1 mM)
- 3 µL rATP (100 nM)
- 3 µL PNK-Puffer (10x)
- 1 µL PNK (10 u/µL)
- 20 µL H<sub>2</sub>O
- 30 Minuten bei 37 °C inkubieren
- 20 Minuten bei 65 °C zur Inaktivierung des Enzyms inkubieren

### 2.11.15 Ligation von Nukleinsäuren

Die Ligation von Nukleinsäuren erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Enzym T4 DNA Ligase von NEB. Für bestimmte Reaktionen musste das Standardprotokoll optimiert werden.

### 2.11.16 Concatamerisierung von DNA-Fragmenten

Um mehrere Kopien eines DNA-Fragmentes seriell angeordnet zu ligieren, wurde folgende Reaktion durchgeführt:

- 4 µL H<sub>2</sub>O
- 30 µL Oligonukleotid-Lösung (5 µM)
- 4 µL Ligationspuffer (10x)
- 2 µL T4 DNA Ligase (3 u/µL)
- 4 h bei RT inkubieren

### 2.11.17 Gelextraktion von DNA

Gelextraktionen von DNA wurden entweder mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerempfehlung oder unter Verwendung von Glasmilch (Vogelstein und Gillespie 1979) durchgeführt.

#### Gelextraktion mit Glasmilch

- lösen des Gels: entsprechendes Volumen N1 Puffer aus MN-Nucleospin Extrakt kit zugeben (ersetzt Bindungspuffer)
- 2 µL Glasmilch (50 % in H<sub>2</sub>O w/v) hinzugeben
- vortexen

- Bindung der DNA an die Glasmilch für 5 min bei RT (invertieren)
- für 1 min bei 7000 g zentrifugieren, ÜS verwerfen
- mit 250 µL Natriumiodid-Bindungslösung waschen
- für 1 min bei 7000 g zentrifugieren, ÜS verwerfen
- 3x in 750 µL NEET (100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 % EtOH (v/v), 10 mM Tris pH 7.5) waschen, jeweils für 1 min bei 7000 g zentrifugieren, ÜS verwerfen
- Pellet für ca. 6 min bei 45 °C in Vakuumzentrifuge trocknen
- Pellet in 15 µL TE/10 resuspendieren, für 5 min auf 50 °C erhitzen
- für 5 min bei Maximalumdrehung zentrifugieren
- wässrige Phase mit DNA abheben
- nochmals zentrifugieren, um restliche Glasmilch zu entfernen

### **2.12 Kultur von Bakterien**

#### **2.12.1 Suspensionskultur von Bakterien**

Suspensionskulturen von Bakterien werden v. a. zur Vermehrung der Bakterien für eine spätere Plasmidisolierung angesetzt. Ein entsprechendes Volumen LB-Medium (supplementiert mit einem geeigneten Antibiotikum) wird angeimpft und bei 37 °C im Inkubationsschüttelschrank (220 rpm) ü. N. inkubiert.

#### **2.12.2 Transformation von Bakterien**

Die Transformation von transformationskompetenten Bakterien erfolgte über einen kurzfristigen (90 s) Hitzeschock (42 °C) nach Standardverfahren.

#### **2.12.3 Bakterienkultur auf Nährstoffplatten**

Zur Kultivierung monoklonaler Bakterienkulturen im Rahmen von Klonierungen wurden Bakterien auf LB-Agar Platten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausgestrichen und ü. N. bei 37 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurden einzelne Bakterienkolonien markiert und zur weiteren Analyse in Suspensionskultur gebracht.

#### **2.12.4 Lagerung von Bakterien als Glycerinkulturen**

Zur längerfristigen Lagerung von Bakterien eignen sich Glycerinkulturen, die bei -80 °C aufbewahrt werden. Hierfür wird ein Aliquot Suspensionskultur mit 25 % (v/v) sterilem Glycerin versetzt, gemischt und eingefroren.



### 2.13 Zellkultur

#### 2.13.1 Medien und Lösungen für die Zellkultur

Biochrom AG (Berlin, Deutschland)

- DMEM (4,5 g/l Glucose, mit Na-Pyruvat, 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, stabiles Glutamin)
- DMEM (4,5 g/l Glucose, mit Na-Pyruvat, 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, ohne Phenolrot)
- FBS (fötales bovines Serum)
- PS (10000 U/mL Penicillin, 10000 µg Streptomycin/mL)
- Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 % / 0,02 %) in PBS ohne Ca<sup>2+</sup> oder Mg<sup>2+</sup>

Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

- DMEM:F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Ham's Nutrient Mix F-12* 1:1) mit L-Glutamin und 15 mM HEPES
- DMEM:F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium: Ham's Nutrient Mix F-12* 1:1) mit L-Glutamin und 15 mM HEPES, ohne Phenolrot

Cambrex Bio Science Verviers, S.p.r.l. (Verviers, Belgien)

- ProCHO-AT CDM (ProCHO-4)
- UltraCHO
- UltraCulture
- MEBM
- MEGM

Fisher Scientific GmbH (Schwerte, Deutschland)

- *charcoal/dextran treated fetal bovine serum* von HyClone

#### 2.13.2 Einwegartikel für die Zellkultur

Sterile Einwegartikel der Firma TPP (Trasadingen, Schweiz) wurde über Biochrom AG (Berlin, Deutschland) bezogen. Zur Lumineszenzmessung wurden 96 MicroWell™ Platten der Firma Nunc GmbH & Co. KG (Wiesbaden, Deutschland) verwendet.

### 2.13.3 Zelllinien

**Tab. 7: Zelllinien**

Bezeichnung, Referenz	Gewebe	Kulturbedingung, Verdünnung
293 ATCC CRL-1573	human, embryonale Niere, Fibroblasten	DMEM + 10 % FBS, 1:8
FTC-133 ECACC 94060901	human, follikuläres Schilddrüsenkarzinom	DMEM + 10 % FBS, 1:8
FTC-238 ECACC 94060902	human, follikuläres Schilddrüsenkarzinom	DMEM/F12 + 10 % FBS, 1:8
HepG2 ATCC HB-8065	human, Leberkarzinom	DMEM/F12 + 10 % FBS, 1:4
HuH-7 RIKEN RCB1366	human, Leberkarzinom	DMEM + 10 % FBS, 1:20
Caco-2 ATCC HTB-37	human, Colonkarzinom	DMEM + 10 % FBS, 1:8
Cos-7 ATCC CRL-1651	Affe, Niere, Fibroblast	DMEM + 10 % FBS, 1:10

### 2.13.4 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem CO<sub>2</sub>-begasbaren Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Alle Medien und Lösungen, mit denen die Zellen in Kontakt kamen, wurden zunächst in einem Wasserbad auf 37 °C temperiert. Die Zellen wurden im subkonfluenten Stadium (Konfluenz von 80-90 %) alle drei bis vier Tage passagiert und dabei je nach Zelldichte im Verhältnis 1:5 bis 1:10 verdünnt (Tab. 7). Dazu mussten diese adhären Zellen vom Substrat abgelöst werden. Zur Schwächung der Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Zelladhäsion wurden die Zellen zunächst zweimal in einem calciumfreien Puffer (PBS) gewaschen. Danach wurden die Zellen für 3-7 Minuten bei 37 °C in Dissoziationsmedium (TEDTA) inkubiert. Der im Dissoziationsmedium enthaltene Ca<sup>2+</sup>-Chelator EDTA reduziert die Restkonzentration an Ca<sup>2+</sup>-Ionen und die Endopeptidase Trypsin hydrolysiert Peptidbindungen bevorzugt an Arginin- oder Lysin-Resten und löst somit Zell-Zell- und Zell-Matrix-Verbindungen. Die Zellen wurden bis maximal Passage 30 verwendet. Bei der Passagierung der Zellen wurde nach folgendem Kurzprotokoll vorgegangen:

- altes Medium entfernen
- zweimal mit PBS waschen
- ein Volumen EDTA zugeben, im Brutschrank inkubieren bis die Zellen abgelöst sind (3-7 min, unter Mikroskop begutachten und ggf. Zellen abklopfen)
- Trypsin durch Zugabe von mind. zwei Volumen FBS-haltigen Mediums inaktivieren
- Zellen durch Triturieren dissoziieren
- Zellen adäquat verdünnt in neuem Kulturgefäß mit frischem Medium aussäen (bzw. Zellzählung)

### 2.13.5 Kryokonservierung von Zellen

Zur Langzeitlagerung zwecks Vermeidung von Alterung und Akkumulation genetischer Variabilität der Zelllinien werden die Zellen in flüssigem Stickstoff (-196 °C) aufbewahrt. Damit die Zellen möglichst bald nach dem Wiederauftauen in ausreichender Anzahl vorhanden sind, sollen die einzufrierenden Kulturen zwar recht dicht, aber auch noch proliferativ sein.

Als Einfriermedium dient das jeweilige Kulturmedium, welches mit 10 % (v/v) DMSO und insgesamt 30 % (v/v) FBS zum Schutz vor Frostschäden supplementiert wird.

- Zellen dissoziieren
- FBS Medium zum Inaktivieren des Trypsins zugeben
- Zellen suspendieren
- auf sterile Zentrifugenröhrchen übertragen
- bei 500 g für 10 min zentrifugieren
- ÜS entfernen
- Zellpellet in 1,5 mL Einfriermedium resuspendieren
- je 1,5 mL Zellsuspension (Zellen einer Flasche) pro Kryoröhrchen abfüllen
- Kryoröhrchen ü. N. bei -80 °C in einer geschlossenen Styroporbox langsam abkühlen
- dann in einen Flüssigstickstoffbehälter (-196 °C) überführen und lagern

### 2.13.6 Auftauen von Kryostocks

Der Auftauvorgang muss schnell durchgeführt werden, um die toxische Wirkung von DMSO gering zu halten.

- Kryoröhrchen direkt von -196 °C in ein 37 °C Wasserbad überführen
- 10 min bei 500 g zentrifugieren
- ÜS (Einfriermedium) entfernen
- in frischem Medium resuspendieren und in eine Kulturflasche überführen
- Medium wechseln, sobald die Zellen adhärieren (nach ca. 6 h)

### 2.13.7 Zellkultur auf Deckgläsern

Zellen, von denen nach Fixierung und ggf. einer immunzytochemischen Färbung mikroskopische Präparate angefertigt werden sollen, werden auf Deckgläsern kultiviert. Hierfür werden sie beim Passagieren geeignet verdünnt und in 24-Well Platten ausgesät, in welche zuvor sterile Deckgläser ( $\varnothing$  15 mm) gelegt wurden.

### 2.13.8 Transfektion der Zellen

Beim Vorgang der Transfektion wird Fremd-DNA in eukaryotische Zellen eingebracht indem entweder die Zellen zur Aufnahme der DNA befähigt werden und/oder die DNA in einen Zustand versetzt wird, in dem sie von den Zellen aufgenommen werden kann. Bei der hier zur Anwendung gebrachten chemischen Transfektion wird die zu transfizierende DNA durch das jeweilige Transfektionsreagenz komplexiert und kann dann von den Zellen endozytotisch aufgenommen werden.

Man unterscheidet zwischen transienter und stabiler Transfektion. Bei der transienten Transfektion wird DNA in den Zellkern eingebracht, wo sie aber nicht in Chromosomen der Zellen integriert. Die von der transfizierten DNA codierten Gene werden nur vorübergehend exprimiert (für ca. 96 h), solange bis die Fremd-DNA abgebaut wird.

Bei der stabilen Transfektion wird die Fremd-DNA entweder in die Chromosomen integriert oder liegt als Episom vor. Stabil transfizierte Zellen exprimieren die transfizierten Gene über längere Zeit und können mithilfe geeigneter Marker (Resistenzgene) selektiert werden.

Für jede verwendete Zelllinie wurde zur Findung der optimalen Reagenz/DNA-Kombination und weiterer Faktoren (Zeit der Komplexbildung, Inkubationsperiode der Zellen mit den Transfektionskomplexen) eine Optimierung der Transfektionseffizienz im 24-Well-Format durchgeführt. Das so ermittelte, optimale Reagenz/DNA-Verhältnis wurde dann entsprechend des verwendeten Kulturformates skaliert. Bei Kotransfektionen musste zusätzlich der relative Anteil der einzelnen Plasmide an der DNA-Gesamtmasse ermittelt werden.

Folgende Reagenzien wurden verwendet:

PolyFect<sup>®</sup> Transfection Reagent, Qiagen<sup>®</sup> (Hilden)

Lipofectamine<sup>™</sup> 2000, Invitrogen (Karlsruhe)

FuGENE 6, Roche (Mannheim)

FuGENE HD, Roche (Mannheim)

### 2.13.9 Mykoplasmen-Test

Um Mykoplasmen-Kontaminationen der verwendeten Zelllinien auszuschließen, wurde das Testsystem MycoAlert der Firma Cambrex Bio Science Verviers, S.p.r.l. (Verviers, Belgien) nach Herstellerangaben verwendet. Neu erworbene Zelllinien wurden zunächst in einer Eingangskontrolle auf Mykoplasmen-Kontamination getestet, bevor davon Kryo-Aliquots angelegt wurden. Nach dem Auftauen solcher Kryo-Aliquots erfolgte erneut ein Mykoplasmentest. In regelmäßigen Abständen wurden zudem alle in Kultur befindlichen Zelllinien des Labors getestet, um die Effektivität der Sterilarbeiten zu kontrollieren.

### 2.13.10 Vitalitätsassays

Für Vitalitäts-Untersuchungen wurde das System CellTiter-Glo der Firma Promega nach Herstellerangaben verwendet. HepG2 Zellen wurden in einer Dichte von  $1 \cdot 10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well Lumineszenzplatte für die Zellkultur ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 24 h mit den zu testenden Substanzen inkubiert. Dann wurde der relative ATP-Gehalt der Zellen durch einen Luziferase-Assay (CellTiter-Glo) bestimmt und mit den Lösungsmittelkontrollen verglichen.

In Ergänzung wurden analog auch MTT-Tests mit dem Kit „Cell Proliferation Kit I (MTT)“ der Firma Roche nach Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.14 T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> Lösungen

Von T<sub>3</sub> und T<sub>4</sub> wurden Stammlösungen (100 µM) hergestellt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Hierfür wurden zunächst Stammlösungen (10 mM) in verdünnter NaOH (40 mM) hergestellt. Zur Korrektur der Einwaage wurden diese Primärlösungen auf ca. 100 µM (1:100) in NaOH (40 mM) verdünnt. Die Konzentrationen C dieser Messlösungen wurden photometrisch durch Messung der Extinktion E bei  $\lambda=322$  nm und 1 cm Pfadlänge bestimmt. Daraus lassen sich die Konzentrationen der Lösungen nach (5) berechnen.

$$C = \frac{E_{322} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{Pfadlänge [cm]}}{\varepsilon} \quad (5)$$

$\varepsilon = 4660$  für T<sub>3</sub> [ $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]

$\varepsilon = 6180$  für T<sub>4</sub> [ $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ] (Gershengorn et al. 1977)

## MATERIAL UND METHODEN

Für die Stammlösungen wurden die Primärlösungen in sterilem H<sub>2</sub>O entsprechend auf 100 µM verdünnt und ggf. wurde hierbei gemäß der photometrisch bestimmten Konzentration eine Korrektur der eingewogenen Konzentration vorgenommen.

Aus den Stammlösungen wurden jeweils am Tag des Experiments frische serielle Verdünnungsreihen in serumfreiem DMEM ohne Phenolrot hergestellt. Die Verdünnungsreihen wurden als 10x konzentrierte Lösungen angesetzt und bei der Injektion in die einzelnen Wells 1:10 verdünnt, sodass sich die gewünschte Endkonzentration im Well ergab.

**Tab. 8: T<sub>3</sub>-Verdünnungsreihe**

10x	Verdünnungsreihe				f.c. im Well
100 µM	T <sub>3</sub> -Stammlösung				10 µM
10 µM	100 µL T <sub>3</sub>	[100 µM]	+	900 µL DMEM	1 µM
1 µM	100 µL T <sub>3</sub>	[10 µM]	+	900 µL DMEM	100 nM
100 nM	100 µL T <sub>3</sub>	[1 µM]	+	900 µL DMEM	10 nM
50 nM	100 µL T <sub>3</sub>	[100 nM]	+	100 µL DMEM	5 nM
30 nM	100 µL T <sub>3</sub>	[100 nM]	+	233 µL DMEM	3 nM
20 nM	100 µL T <sub>3</sub>	[100 nM]	+	400 µL DMEM	2 nM
10 nM	100 µL T <sub>3</sub>	[100 nM]	+	900 µL DMEM	1 nM
3 nM	100 µL T <sub>3</sub>	[10 nM]	+	233 µL DMEM	300 pM
1 nM	100 µL T <sub>3</sub>	[10 nM]	+	900 µL DMEM	100 pM
100 pM	100 µL T <sub>3</sub>	[1 nM]	+	900 µL DMEM	10 pM

In der linken Spalte sind die Konzentrationen der 10x T<sub>3</sub>-Lösungen für die Verdünnungsreihe angegeben. In der mittleren Spalte ist das Pipettierschema für die Verdünnungsreihe dargestellt. Die rechte Spalte gibt die jeweilige Endkonzentration im Well nach Verdünnung (1:10) an.

### 2.14.1 Testsubstanzen

Von den Testsubstanzen wurden Stammlösungen (100 mM) in DMSO hergestellt. Diese wurden aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Am Tag eines Experiments wurden von diesen Aliquots serielle Verdünnungsreihen hergestellt. Zur Verdünnung wurde eine 0,5%ige DMSO Lösung in serumfreiem DMEM ohne Phenolrot verwendet, die auch als Lösungsmittelkontrolle in Zellexperimenten mit den Testsubstanzen diente.

**Tab. 9: Testsubstanzen**

Substanz	Abkürzung	CAS-Nummer	Bezugsquelle
3,3',5-Triiod-thyroessigsäure	Triac	1596-67-4	Dr. Thoma, Henning Berlin
3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin	T <sub>4</sub>	51-48-9	Dr. Thoma, Henning Berlin
3,3',5'-Triiod-L-thyronin	rT <sub>3</sub>	5817-39-0	Dr. Thoma, Henning Berlin
3,3',5-Triiod-L-thyronin	T <sub>3</sub>	6893-02-3	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3,3'-Diiod-L-thyronin	3,3'-T <sub>2</sub>	70-40-6	Dr. Thoma, Henning Berlin
3,5-Diiod-L-thyronin	3,5-T <sub>2</sub>	1041-01-6	Dr. Thoma, Henning Berlin
3',5'-Diiod-L-thyronin	3',5'-T <sub>2</sub>	60363-25-9	Dr. Thoma, Henning Berlin
3'-Iod-L-thyronin	3'-T <sub>1</sub>	4732-82-5	Dr. Thoma, Henning Berlin
3-Iod-L-thyronin	3-T <sub>1</sub>	16170-92-6	Dr. Thoma, Henning Berlin
4-Methylbenzylidenkampfer	4MBC	36861-47-9	Merck KGaA, Darmstadt
4-Nonylphenol	4NP	104-40-5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Acetochlor	ACETO	34256-82-1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Apigenin	API	520-36-5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Benzophenon-2	BP2	131-55-5	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Benzophenon-3	BP3	131-57-7	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bisphenol A	BPA	80-05-7	Merck KGaA, Darmstadt
Dibutylphthalat	DBP	84-74-2	MP Biomedicals Europe, Illkirch,
F21388	F21388	104567-72-8	Prof. Dr. Schreier, Uni Würzburg
GC-1	GC-1	211110-63-3	Prof. Dr. Scanlan, OHSU,
GC-24	GC-24	656260-08-1	Prof. Dr. Scanlan, OHSU,
Genistein	GEN	446-72-0	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Hispidulin	HIS	1447-88-7	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Linuron	LIN	330-55-2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Myristicin	MYR	607-91-0	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Naringenin	NAR	67604-48-2	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NH-3	NH-3	447415-26-1	Prof. Dr. Scanlan, OHSU,
Nitrofen	NIT	1836-75-5	Dr. Opitz, IGB Berlin
Octylmethoxycinnamat	OMC	5466-77-3	Merck KGaA, Darmstadt
Procymidon	PRO	32809-16-8	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Quercetin	QUE	6151-25-3?	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Resveratrol	RES	501-36-0	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Silymarin	SIL	65666-07-1	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tetrabromobisphenol A	TBBPA	79-94-7	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Thyronin	T <sub>0</sub>	1596-67-4	Dr. Thoma, Henning Berlin
Xanthohumol	XN	6754-58-1	Prof. Dr. Becker, Saarbrücken

### 2.14.2 Fixieren von Zellen

Das Fixieren dient der Erhaltung von zellulären Strukturen. Dies geschieht durch Fixiermittel, welche über chemische Reaktionen eine intermolekulare Quervernetzung zellulärer Moleküle hervorrufen.

### 2.14.3 Paraformaldehyd-Fixierung

PFA-Fixierungen wurden in 24-Well Platten nach folgendem Protokoll durchgeführt:

- Zellen zweimal mit 1x PBS waschen
- für 10 min bei RT mit 200  $\mu$ L 4 % Paraformaldehydlösung (w/v) fixieren
- Fixativ absaugen
- zweimal mit 1x PBS waschen
- direkt in Einbettmedium eindecken oder zunächst eine immuncytochemische Färbung vornehmen

### 2.14.4 X-gal Färbung

Im Rahmen von Transfektionsoptimierungen wurden Zellen mit einem  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ Gal) -Expressionsvektor transfiziert. Zum Nachweis von  $\beta$ -Gal-transfizierten Zellen wurde die Zellen nach einer 24-stündiger Transfektionsphase mit einer 4%igen Paraformaldehydlösung in PBS für 10 min fixiert. Dann wurden die Zellen zweimal in einer Waschlösung (1 mM  $\text{MgCl}_2$  in PBS) gewaschen und für 0,5 bis 3 h unter Inkubation bei 37 °C mit X-Gal-Färbelösung (2,5 mM X-Gal als 40x Stammlösung in Dimethylformamid vorgelöst; 1  $\mu$ M  $\text{MgCl}_2$ ; 5 mM  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 5 mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  in 1x PBS) gefärbt. Danach wurde die Färbelösung durch PBS ersetzt und die Zell-Färbung ausgewertet.

### 2.15 DAPI-Färbung

Zur Darstellung des Zellkerns wurde eine DNA-Färbung mit dem Farbstoff DAPI (Invitrogen, Karlsruhe) durchgeführt. Hierfür wurden fixierte Zellen vor dem Eindecken für 5 Minuten mit einem ausreichend großen Volumen (30  $\mu$ L pro Deckglas) DAPI-Gebrauchslösung (1  $\mu$ g/mL in 1x PBS) bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und eingedeckt



### 2.16 Mikroskopische Methoden

Die primären mikroskopischen Bilddaten lagen in einem speziellen Grafikformat (zvi) der Firma Zeiss vor. Um mit diesen Dateien in beliebigen Bildbearbeitungsprogrammen arbeiten zu können, wurden diese Rohdaten in 16-Bit-Graustufenbilder des Tiff-Dateiformats (Tagged Image File Format) - ein Standard-Grafikformat - konvertiert. Im Bildbearbeitungsprogramm Photoshop (Adobe Systems, Köln) wurden ggf. Kontrastverstärkungen und Tonwertkorrekturen vorgenommen.

### 2.17 Proteinbiochemische Methoden

#### 2.17.1 Lagerung von Proteinlösungen

Zur langfristigen Lagerung wurden frisch aliquotierte Proteinlösungen, wie Antikörper, bei -20 °C gelagert. Nach einmaligem Auftauen wurden sie nicht mehr eingefroren, um Schädigungen durch wiederholte Einfrier-/Auftau-Zyklen zu vermeiden.

#### 2.17.2 Herstellen von Zelllysaten

Zur Herstellung von Zelllysaten wurden die Zellen 48 Stunden vor der Präparation in kleine Kulturschalen ( $\varnothing$  35 mm) ausgesät und dabei so verdünnt, dass sie am Tag der Präparation konfluent waren. Transfektionen wurden 24 Stunden vor der Präparation durchgeführt. Zum Herstellen der Lysate wurde nach diesem Protokoll verfahren:

- 2x mit kaltem (4 °C) 1x PBS waschen
- für 10 min in 500  $\mu$ L modifizierten RIPA-Puffer (4 °C) auf Eis inkubieren
- Zellen mit einem Gummischaber (rubber policeman) abschaben, mikroskopisch kontrollieren
- in 1,5 mL Reaktionsgefäß auf Eis überführen, 10 min auf Eis wippend inkubieren
- 15 s vortexen
- 15 min bei 14000 g bei 4 °C zentrifugieren
- ÜS aliquotieren und bei 4 °C lagern

#### 2.17.3 Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford 1976)

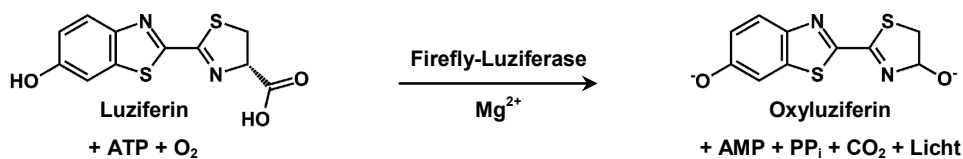
Bei dieser Methode zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration einer Lösung wird ein Farbreagenz, dessen Absorptionsmaximum bei Bildung von Protein/Reagenz-Komplexen von  $\lambda = 465$  nm auf  $\lambda = 595$  nm verschoben wird, verwendet. Die Stärke der Absorption bei  $\lambda = 595$  nm ist proportional zur Proteinkonzentration.

Es wurde das Bradfordreagenz der Firma Sigma (Taufkirchen) nach Herstellerangabe verwendet. Hierzu wurden 500  $\mu$ L Bradfordlösung und 500  $\mu$ L der verdünnten (s.u.)

Proteinlösung in Einweg-Kunststoffküvetten gegeben und die Extinktion bei  $\lambda=595$  nm im Spektrophotometer bestimmt. Als Referenz wurde ein Milliliter einer 50%igen Bradfordlösung (v/v) in H<sub>2</sub>O bidest. verwendet. Als Eichreihen dienten BSA-Lösungen in H<sub>2</sub>O bidest. mit bekannten Protein-Konzentrationen von 2 bis 16  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Die Konzentration der Zelllysate wurde in Verdünnungsreihen (1:500, 1:200, 1:100 in H<sub>2</sub>O bidest.) bestimmt.

### 2.17.4 Luziferase-Assay

Luziferase-Assays wurden mit Kits der Firma Promega nach einem selbst optimierten Protokoll durchgeführt. Die Zellen wurden mit einem Reportergenkonstrukt, das als Reportergen die Firefly-Luziferase (FLuc, Abb. 6) des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* trägt, transfiziert. Gegebenenfalls wurden noch weitere Plasmide kotransfiziert und die Zellen für eine bestimmte Zeitperiode unter verschiedenen experimentellen Bedingungen inkubiert, bevor der Luziferase-Assay durchgeführt wurde. Zellen, die in zellkulturtauglichen 96-Well Lumineszenzmessplatten kultiviert und experimentell behandelt worden waren, konnten direkt in diesen Wells lysiert werden. Hierfür wurden die Zellen zum gegebenen Zeitpunkt einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und unter Schütteln (900 rpm, DELFIA Plateshake) in 20  $\mu\text{L}$  1x Lysis Puffer (passive lysis buffer, PLB) für 15 min bei RT lysiert. Der Luziferase-Assay erfolgte dann in den Messplatten. Wurden die Zellen in Kulturplatten größeren Formats kultiviert und behandelt, so wurden sie ebenfalls zunächst in eiskaltem PBS gewaschen und dann in einem geeigneten Volumen (100  $\mu\text{L}$  pro 24-Well, 250  $\mu\text{L}$  pro 24-Well, 500  $\mu\text{L}$  pro 6-Well) 1x Lysis Puffer unter Schütteln für 15 min bei RT lysiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Wells gekratzt, dann wurde das Lysat in Reaktionsgefäße überführt, gevortext und für 15 s bei 12000 g zentrifugiert. Von dem geklärten Überstand wurden je 20  $\mu\text{L}$  in eine weiße 96-Well Lumineszenzmessplatte überführt. Der Proteingehalt des Überstands wurde zur Normalisierung der Luziferase-Werte bestimmt. Zu den 20  $\mu\text{L}$  Lysat wurde pro Well durch das Luminometer je 30  $\mu\text{L}$  Substratlösung injiziert. Nach 1 s Verzögerung erfolgte eine 5-sekündige Messung der Lumineszenz als relative Einheit (*relative light unit*, RLU). Danach wurde das nächste Well prozessiert.

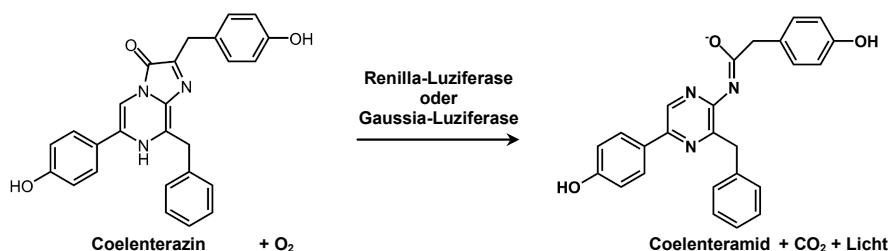


**Abb. 6: Firefly-Luziferase-Reaktion**

Es wird die von der Firefly-Luziferase katalysierte Reaktion mit den Substrat- und Produktstrukturen dargestellt.

## 2.17.5 Dual-Luciferase Assay

Zur Normalisierung der FLuc-Werte wurde das Gen einer weiteren Luziferase, die eine andere Substratspezifität besitzt, kotransfiziert. Hierzu wurde entweder eine Luziferase aus der Koralle *Renilla reniformis* (RLuc, Abb. 7) oder die Luziferase aus dem Copepoden *Gaussia princeps* (GLuc) verwendet. Diese Enzyme katalysieren folgende ATP-unabhängige Reaktion:



**Abb. 7: Renilla- oder Gaussia-Luziferase-Reaktion**

Es wird die von der Renilla-Luziferase bzw. Gaussia-Luziferase katalysierte Reaktion mit den Substrat- und Produktstrukturen dargestellt.

Die Aktivitäten von FLuc und RLuc bzw. GLuc können seriell aus derselben Probe im selben Well bestimmt werden, da der Reaktionspuffer der RLuc bzw. GLuc die Reaktion der FLuc stoppt. Zur Normalisierung von unterschiedlichen Transfektionseffizienzen beim Vergleich mehrerer Transfektionen bildet man dann das Verhältnis FLuc [RLU] / RLuc [RLU].

Für die Messung wurde das Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega, Mannheim) verwendet. Die Lyse der Zellen wurde mit PLB nach dem schon beschriebenen Protokoll durchgeführt. Zu 20 µL Lysat wurden zunächst 30 µL Luciferase Assay Buffer II (FLuc-Substratlösung) injiziert und nach einer Sekunde Verzögerung erfolgte für 5 s die Messung der FLuc-Aktivität in RLU. Daraufhin wurden 30 µL Stop & Glo<sup>®</sup> Buffer (RLuc- bzw. GLuc-Substratlösung) injiziert und nach einer Sekunde Verzögerung die Aktivität der jeweiligen Normalisierungs-Luziferase für 5 s gemessen.

### 2.18 Statistische Analyse

Eine Beratung zur Vorgehensweise bei der statistischen Auswertung erfolgte durch Dr. Konrad Neumann (Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité) und Dr. Robert Opitz (Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei). Die Werte in Grafiken sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) oder Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben. Zum Vergleich von zwei Gruppen normalverteilter Daten wurde der Student's t-Test verwendet. Für den statistischen Vergleich von mehr als zwei Gruppen mit einer Kontrollgruppe wurde eine Varianzanalyse (ANOVA, *analysis of variance*) gefolgt von dem Dunnett-Test durchgeführt. Hierzu wurde zunächst geprüft, ob eine Normalverteilung und eine Homogenität der Varianzen vorliegen (Shapiro-Wilk Test, D'Agostino-Pearson Test oder Kolmogorov-Smirnov Test). Um diese Kriterien zu erfüllen, wurde ggf. eine logarithmische Transformation der Daten vorgenommen. Als statistisch signifikant wurden Werte mit einem p-Wert kleiner 0,05 bezeichnet ( $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ,  $p < 0,001^{***}$ ). Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism 4. Zur Berechnung der Dosis-Wirkungskurven und  $EC_{50}$ -Werte bzw.  $IC_{50}$ -Werte wurden die Daten zunächst logarithmisch transformiert, dann erfolgte eine Normalisierung der Daten, indem der Maximalwert auf 100 % gesetzt wurde und schließlich wurde mit der Funktion „sigmoidal dose-response“ der Software GraphPad Prism 4 eine Kurvenanpassung berechnet.

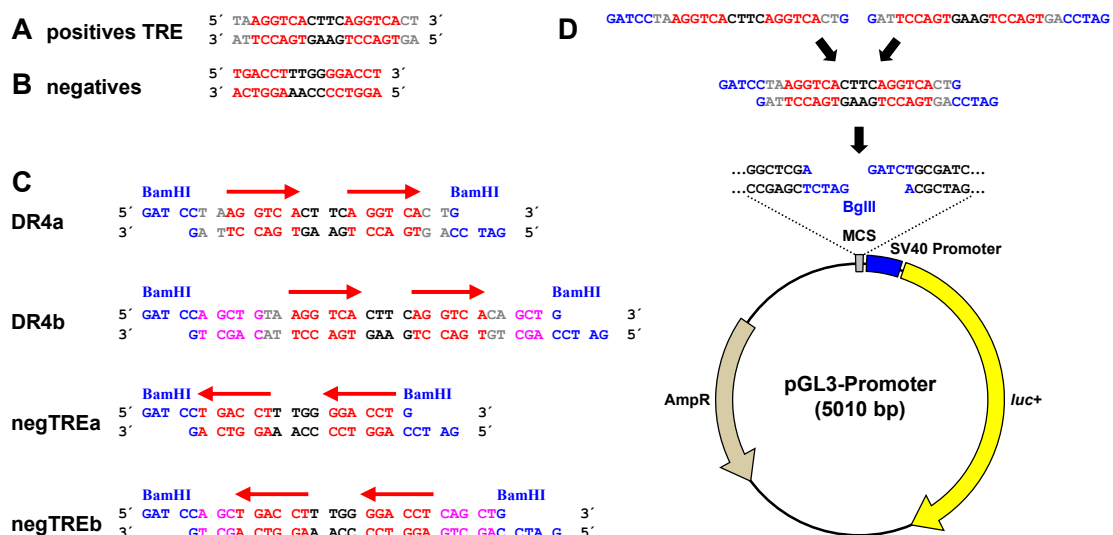
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Konstruktion von T<sub>3</sub>-Reportergenplasmiden

Mit einem Reportergenassay kann man die Aktivität genregulatorischer Faktoren untersuchen. T<sub>3</sub> reguliert - vermittelt durch TR und TRE - die Expression von Zielgenen. Daher bietet sich ein Reportergenassay zur Untersuchung der T<sub>3</sub>-abhängigen Genregulation und möglicher Interferenzen von ED an. Zur Etablierung eines solchen T<sub>3</sub>-Reportergenassays wurden zunächst T<sub>3</sub>-Reportergenplasmide mit TRE konstruiert.

##### 3.1.1 Klonierung von p(DR4)<sub>1</sub>-SV40-*luc*<sup>+</sup> und p(negTRE)<sub>1</sub>-SV40-*luc*<sup>+</sup>

Die geplanten T<sub>3</sub>-Reportergenplasmide basierten auf einem positiv-T<sub>3</sub>-responsiven Element (DR4, Abb. 8A) und einem negativen TRE (negTRE, Abb. 8B), in denen die beiden *half-sites* durch 4 Nukleotide voneinander getrennt sind (Chang und Wei 1997). Zusätzlich wurden die Nukleotide in direkter Nachbarschaft der Konsensussequenz gemäß den Erkenntnissen aus Publikationen zur detaillierten Charakterisierung von optimalen TRE modifiziert (Katz und König 1993; Katz und König 1994; Harbers et al. 1996; Quack et al. 2002) (Abb. 8C). Die Oligonukleotide der vier monomeren Inserts (DR4a, DR4b, negTREa, negTREb) wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

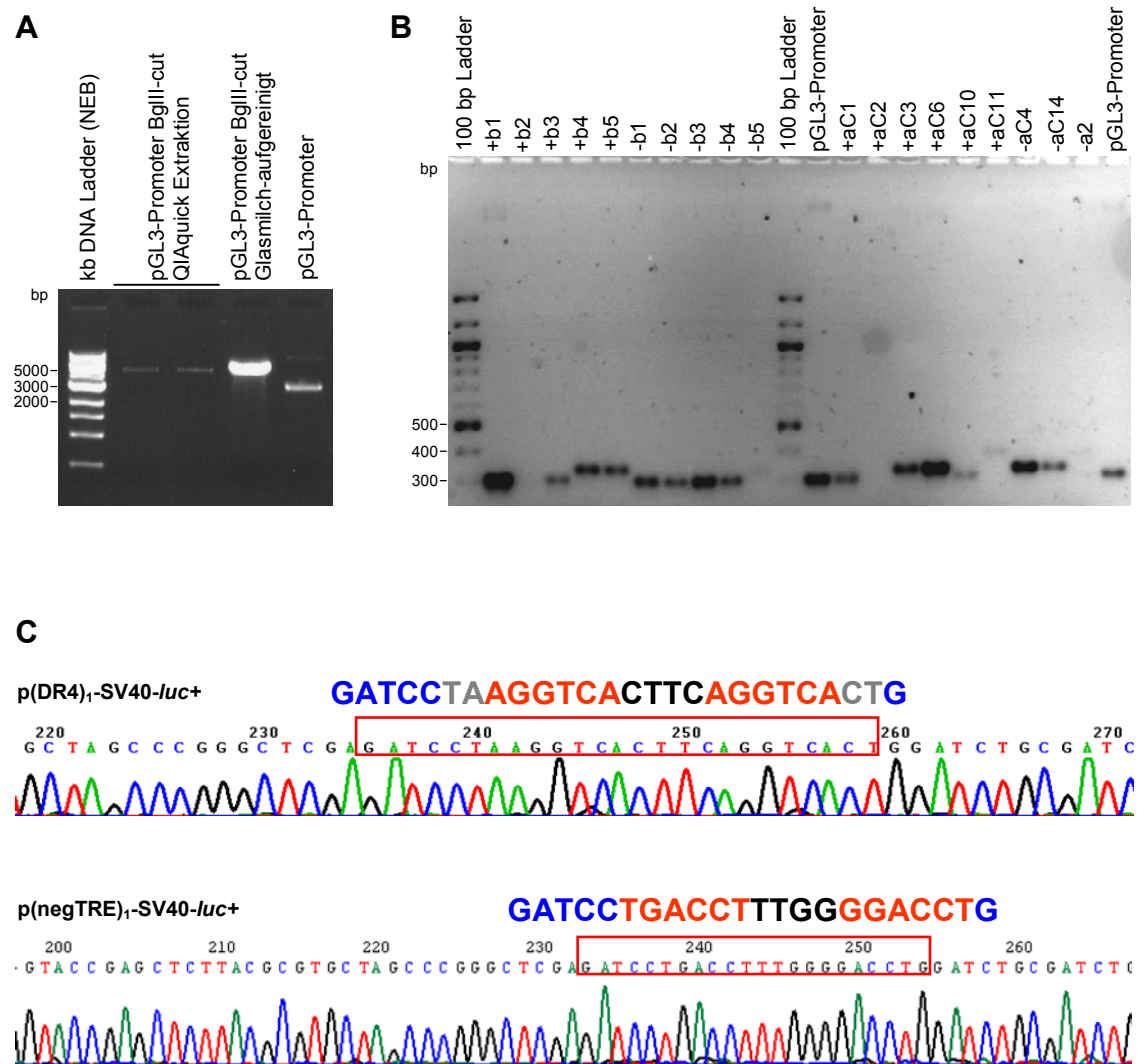


**Abb. 8: Klonierungsstrategie für p(DR4)<sub>1</sub>-SV40-*luc*<sup>+</sup>**

Darstellung des geplanten positiven (A) und des negativen TRE (B) mit Hervorhebung der *half-sites* in roter Schrift. Darstellung der Inserts, welche die TRE und passende Linker (blau) für eine BamHI-Schnittstelle enthalten (C). In den Varianten DR4b und negTREb sind im Vergleich zu den Varianten DR4a bzw. negTREa zusätzliche Nukleotide enthalten, sodass sich bei der Concatamerisierung ein um 8 bp längerer Abstand (Spacer, pink) zwischen den TRE ergibt. Schematische Darstellung der Konstruktion von p(DR4)<sub>1</sub>-SV40-*luc*<sup>+</sup> (D). Die einzelsträngigen Oligonukleotide wurden zu den doppelsträngigen Inserts DR4a hybridisiert. Diese wurde 5'-terminal phosphoryliert und in die BglII-Schnittstelle des Plasmids pGL3-Promoter ligiert.

## ERGEBNISSE

Die verschiedenen Paare einzelsträngiger Oligonukleotide wurden jeweils zu doppelsträngiger DNA hybridisiert. Nach 5'-Phosphorylierung wurden DR4a und negTREa in die BglIII-Schnittstelle des Plasmids pGL3-Promoter inseriert (Abb. 8D und 9A-C). Die konstruierten Plasmide wurden durch Sequenzierung überprüft (Abb. 9C und 12).



**Abb. 9: Konstruktion von p(DR4)<sub>1</sub>-SV40-luc+ und p(negTRE)<sub>1</sub>-SV40-luc+**

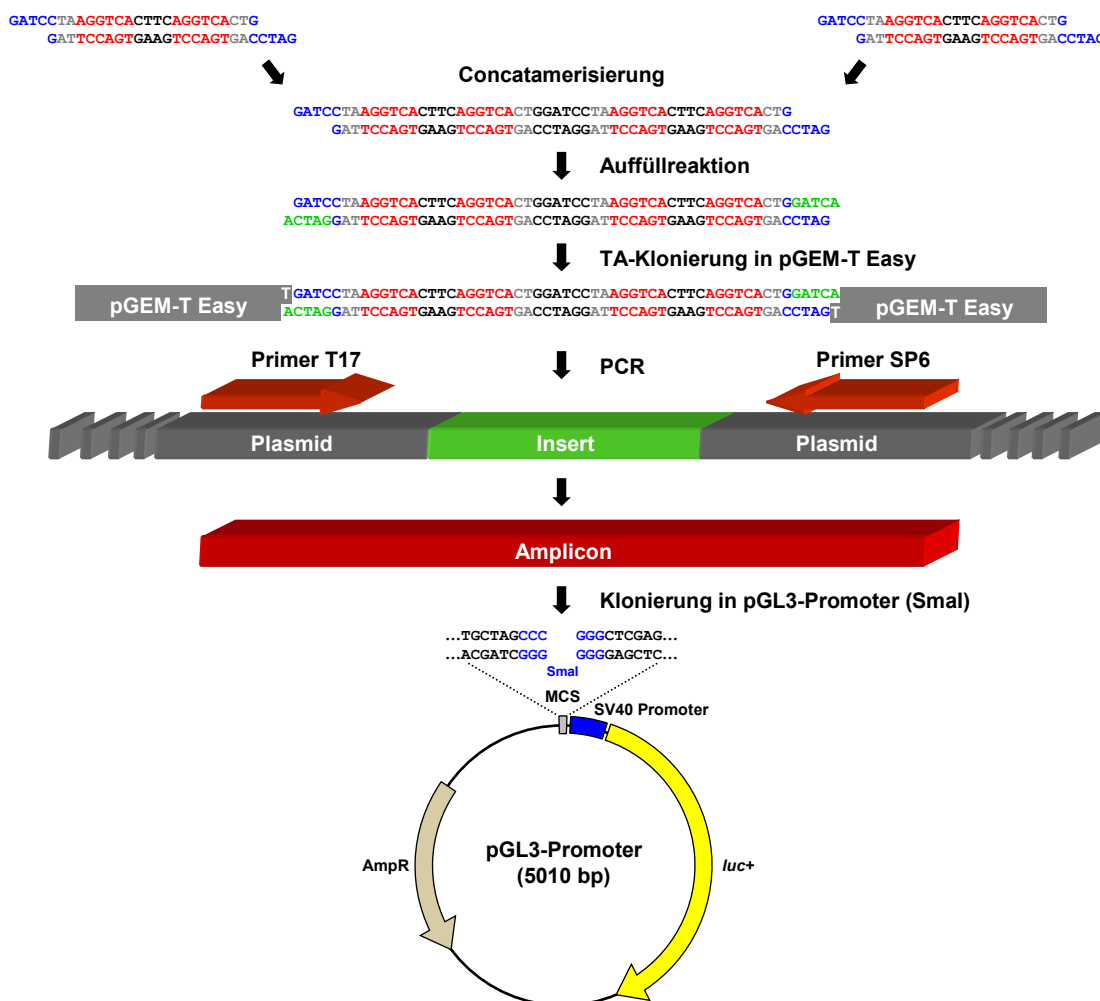
Zum Linearisieren des Zielvektors pGL3-Promoter (Promega, Mannheim) wurden 20 µg Plasmid-DNA mit der Restriktionsendonuklease BglIII verdaut. Nach Auftrennung in einem präparativen Gel wurde der geschnittene Vektor extrahiert (zwei Ansätze mit dem QIAquick Gel Extraction Kit und ein Ansatz durch Glasmilchaufreinigung (A)).

Das aufgereinigte Plasmid pGL3-Promoter (5010 bp) wurde mit den verschiedenen Inserts ligiert (B). Das Screening der erhaltenen Klone erfolgte mittels PCR (Primer: FwdSeq-GL3 und RevPCR-GL3). Das Produkt ohne Insert wurde bei 298 bp erwartet und Amplikons von Insert-positiven Klonen bei ca. 330 bp.

Chromatogramme der Sequenzierungen von p(DR4)<sub>1</sub>-SV40-luc+ und p(negTRE)<sub>1</sub>-SV40-luc+ mit Hervorhebung der TRE-Inserts sind in (C) abgebildet.

### 3.1.2 Klonierung von p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ und p(negTRE)<sub>3</sub>-SV40-*luc*+

Um eine serielle Anordnung mehrerer Kopien der monomeren Inserts aus Abb. 8 zu erreichen, wurden diese an ihren 5'-Hydroxyl-Termini phosphoryliert. Anschließend wurden die phosphorylierten Inserts in Ligasereaktionen concatamerisiert (Abb. 10 und 11A). Danach erfolgte eine Aufreinigung der Concatamerisierungs-Ansätze durch eine Phenol-Chloroform-Isomaylalkohol-Extraktion und eine ethanolische Präzipitation. Die 3'-rezessiven Enden der Concatamere wurden in einer Reaktion mit Taq-Polymerase aufgefüllt und durch TA-Klonierung in das Plasmid pGEM<sup>®</sup>-T Easy (Promega, Mannheim) subkloniert (Abb. 10). Nach Selektion mittels Colony-PCR wurden die TRE ausgewählter Klone durch PCRs mit den Primern T17 und SP6 unter Zuhilfenahme einer Pfu-Polymerase amplifiziert. Die erhaltenen Amplikons wurden in die *Sma*I-Schnittstelle von pGL3-Promoter inseriert. Durch nachfolgende Sequenzierung wurden die Klone p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ und p(negTRE)<sub>3</sub>-SV40-*luc*+ identifiziert (Abb. 11D, 12).

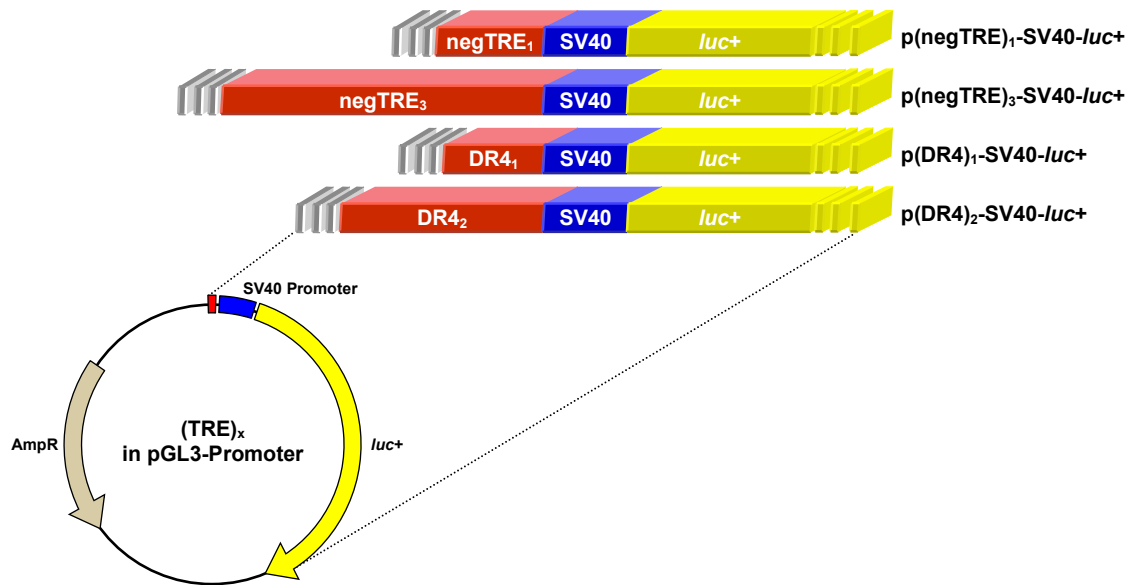


**Abb. 10: Klonierungsstrategie für p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+**

Das 5'-terminal phosphorylierte Insert DR4a wurde concatamerisiert, dann erfolgte eine Reaktion mit Taq-Polymerase zum Auffüllen der Termini und die Subklonierung in pGEM-T Easy. Durch eine blunt-end-PCR mit Pfu-Polymerase wurde das Insert amplifiziert und im nächsten Schritt in die *Sma*I-Restriktionsstelle von pGL3-Promoter ligiert.





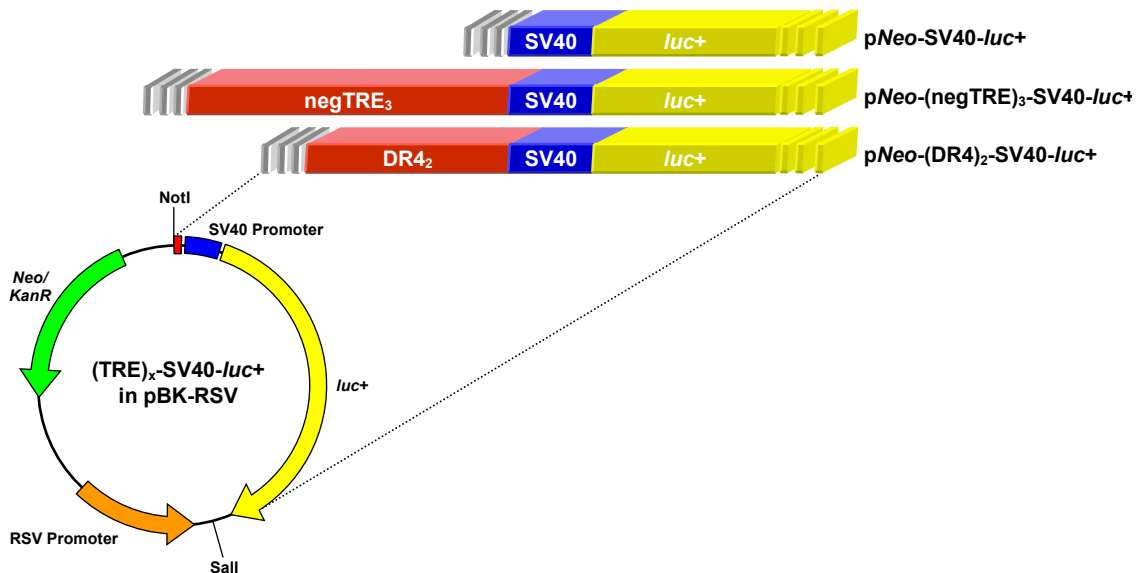


**Abb. 12: Konstruierte pGL3-T<sub>3</sub>-Reporterplasmide**

Übersicht über die konstruierten T<sub>3</sub>-Reporterplasmide auf Basis des Plasmids pGL3-Promoter. Alle Plasmide tragen einen SV40 Promotor und das Luziferase-Gen *luc+*.

### 3.1.3 T<sub>3</sub>-Reporterplasmide zur stabilen Transfektion

Das Plasmid pBK-RSV besitzt eine Neomycinresistenz und eignet sich daher zur Selektion und Etablierung stabil transfizierter Zellklone.



**Abb. 13: T<sub>3</sub>-Reporterplasmide zur stabilen Transfektion**

Überblick über die konstruierten T<sub>3</sub>-Reporterplasmide zur stabilen Transfektion von Zellen. In das Kontrollplasmid pNeo-SV40-luc+ wurden nur der SV40 Promotor und die Firefly-Luziferase subkloniert. pNeo-(DR4)<sub>2</sub>-SV40-luc+ trägt zusätzlich zwei positive TRE und pNeo-(negTRE)<sub>3</sub>-SV40-luc+ drei negative TRE.

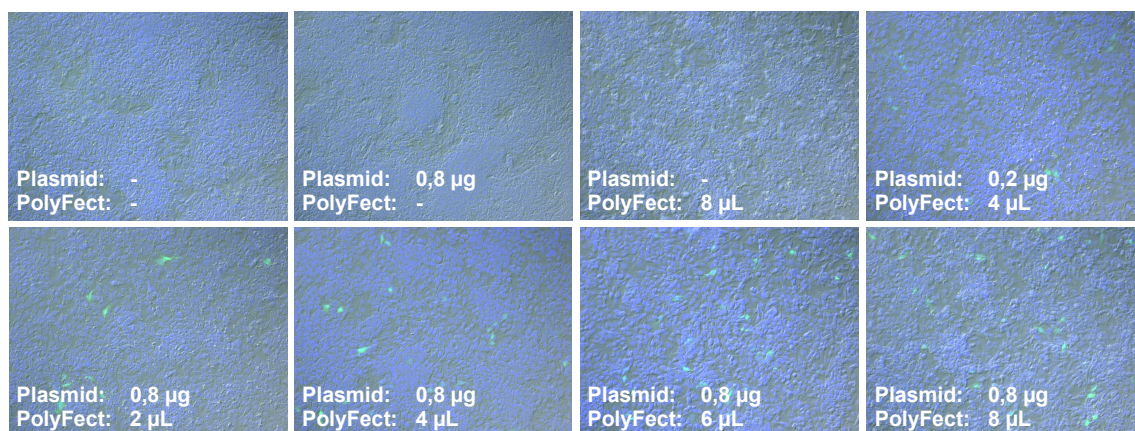
Die TRE, der SV40-Promotor sowie das *luc+* Gen wurden in einem Stück aus den Plasmiden  $p(\text{DR4})_2\text{-SV40-}luc+$  und  $p(\text{negTRE})_3\text{-SV40-}luc+$  über die Restriktionsschnittstellen der Enzyme NotI und Sall herausgeschnitten und über die NotI- und Sall-Schnittstellen in die MCS von pBK-RSV subkloniert (Abb. 13). Die Überprüfung der Klonierung erfolgte durch die Sequenzierung der Plasmide. Zur Transfektion wurden die so konstruierten Plasmide zunächst mit Sall linearisiert, um den Einfluss des RSV-Promotors zu minimieren und die Integration des Reportergens ins Genom zu fördern.

### 3.2 Charakterisierung und Optimierung des T<sub>3</sub>-Reporterassays

#### 3.2.1 Transfektionsoptimierung

Für manche der untersuchten Zelllinien (HEK 293, Cos-7, CHO-K1, HeLa) bietet der Hersteller von PolyFect (Qiagen, Hilden) bereits optimierte Transfektionsprotokolle an. Transfektionsoptimierungen für andere Zellen (HepG2, FTC-133, FTC-238, Caco-2, CV1, ML1 und GH3) wurden selbst durchgeführt und hier wird exemplarisch die Optimierung für HepG2 Zellen dargestellt.

Zur Ermittlung der optimalen Transfektionsbedingungen wurden  $3 \cdot 10^5$  HepG2 pro Well einer 24-Well Platte auf sterilen Deckgläsern ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit unterschiedlichen pEGFP-C1/PolyFect Kombinationen transfiziert (0,2; 0,4; 0,6; 0,8 µg DNA und 0,5; 1; 2; 4; 6; 8 µL PolyFect). Nach 24 h wurden die Zellen fixiert und zur Darstellung der Nuklei mit DAPI gefärbt. Zum Vergleich der Transfektionseffizienzen erfolgte eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung, die für einen Teil der pEGFP-C1/PolyFect Kombinationen in Abb. 14 dargestellt ist.



**Abb. 14: PolyFect-Transfektionsoptimierung für HeG2 Zellen**

HepG2 Zellen wurden in einer Dichte von  $3 \cdot 10^5$  Zellen/Well in einer 24-Well Platte auf sterilen Deckgläsern ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen zur Transfektion für 24 h mit den angegebenen Kombinationen von pEGFP-C1 und PolyFect inkubiert. Dann erfolgten eine PFA-Fixierung und eine DAPI-Färbung der Zellen. Aufnahmen im Differentiellen Interferenz Kontrast sowie Aufnahmen der DAPI- und EGFP-Fluoreszenz sind hier überlagert dargestellt.

## ERGEBNISSE

Die Verwendung von 6 bzw. 8  $\mu\text{L}$  PolyFect führte zu morphologischen Veränderungen der Zellen, die auf eine toxische Wirkung des Transfektionsreagenzes hindeuteten. Die beste Transfektionseffizienz ohne Induktion morphologischer Zellveränderungen wurde mit 0,8  $\mu\text{g}$  Plasmid und 4  $\mu\text{L}$  PolyFect erzielt. Daher wurde die so ermittelte Kombination an DNA und PolyFect als optimal gewertet und für Transfektionen in größeren Zellkulturgefäßen entsprechend der Wachstumsfläche skaliert (Tabelle 10). Unter Verwendung des Reportergenplasmids pBPLUGA und Auswertung mittels X-Gal Färbung wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt (nicht dargestellt).

**Tab. 10: Optimierte Parameter für die Transfektion von HepG2 Zellen**

Zellkultur-Maßstab	Anzahl HepG2 Zellen	DNA [ $\mu\text{g}$ ]	PolyFect [ $\mu\text{L}$ ]
<b>24-Well</b>	<b><math>3 \cdot 10^5</math></b>	<b>0,8</b>	<b>4</b>
<b>12-Well</b>	<b><math>5,7 \cdot 10^5</math></b>	<b>1,5</b>	<b>8</b>
<b>6-Well</b>	<b><math>1,4 \cdot 10^6</math></b>	<b>4</b>	<b>20</b>
<b>T-25 Flasche</b>	<b><math>3,9 \cdot 10^6</math></b>	<b>10</b>	<b>50</b>
<b>T-75 Flasche</b>	<b><math>1,2 \cdot 10^7</math></b>	<b>30</b>	<b>150</b>
<b>T-150 Flasche</b>	<b><math>2,4 \cdot 10^7</math></b>	<b>60</b>	<b>300</b>

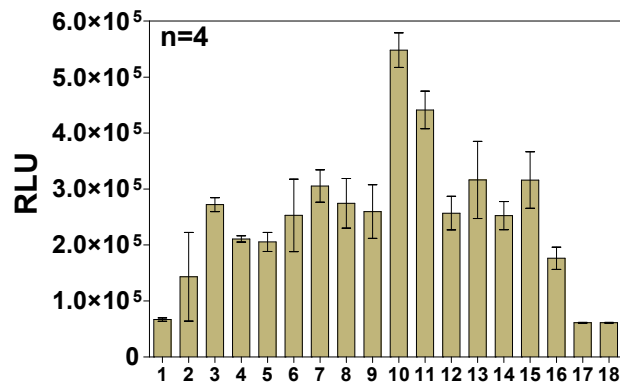
### 3.2.2 Transfektionsoptimierung für 96-Well Platten

Um die Transfektionsprozedur auf die kleineren Volumina für Einzeltransfektionen im Format von 96-Well Platten anzupassen, wurde eine eigene Transfektionsoptimierung durchgeführt. Hierzu wurden  $2 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen pro Well einer 96-Well Lumineszenzmessplatte ausgesät und nach 24 h mit unterschiedlichen p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc+*/PolyFect Kombinationen transfiziert. Durch Messung der basalen Luziferase-Expression im Luziferase-Assay nach weiteren 24 h wurden die Ansätze miteinander verglichen. Alle Ansätze wurden im Quadruplikat durchgeführt. Die höchsten RLU wurden mit 150 ng DNA und 1  $\mu\text{L}$  PolyFect pro Well erreicht (Abb. 15, Tabelle 11).

**A**

Ansatz	DNA [ng/Well]	PolyFect [ $\mu$ L/Well]
1	50	0,125
2	50	0,25
3	50	0,5
4	50	1
5	100	0,25
6	100	0,5
7	100	1
8	100	1,5
9	150	0,5
<b>10</b>	<b>150</b>	<b>1</b>
11	150	1,5
12	150	2
13	200	0,5
14	200	1
15	200	1,5
16	200	2
17	-	2
18	200	-

**B**

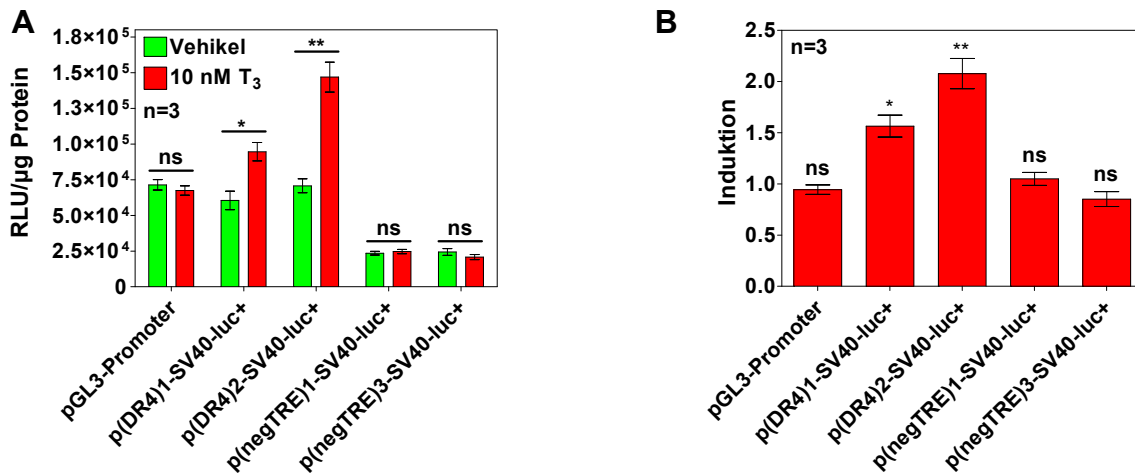


**Abb. 15: Transfektionsoptimierung für das 96-Well Format**

Am Tag vor der Transfektion wurden  $2 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen pro Well in einer sterilen 96-Well Lumineszenzmessplatte ausgesät. Die Zellen wurden mit den in A angegebenen p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ / PolyFect Kombinationen transfiziert und 24 h später wurde ein Luziferase-Assay durchgeführt (B). Die Säulen im Diagramm repräsentieren die Mittelwerte von 4 Replikaten  $\pm$  SEM.

### 3.2.3 Vergleich der pGL3-Reportergenkonstrukte

Zum Vergleich der vier konstruierten pGL3-basierten T<sub>3</sub> Reportergenplasmide wurden  $6 \cdot 10^5$  HepG2 Zellen pro Well in 12-Well Platten ausgesät und am kommenden Tag mit 1,5  $\mu$ g DNA und 8  $\mu$ L PolyFect pro 12-Well transient transfiziert. Weitere 24 h später wurden die Transfektanten für 24 h mit 10 nM T<sub>3</sub> oder mit phenolrothaltigem DMEM/F12 + 10 % FBS als Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Dann wurde die Proteinkonzentration bestimmt und ein Luziferase-Assay durchgeführt. Alle Ansätze wurden mit 4 Replikaten durchgeführt. Die Luziferase-Expression der Plasmide pGL3-Promoter, p(negTRE)<sub>1</sub>-SV40-*luc*+ und p(negTRE)<sub>3</sub>-SV40-*luc*+ wurde durch 10 nM T<sub>3</sub> statistisch nicht signifikant beeinflusst (t-Test). Bei Transfektion mit p(DR4)<sub>1</sub>-SV40-*luc*+ wurde die Luziferase-Expression durch 10 nM T<sub>3</sub> um den Faktor 1,6 und bei Transfektion mit p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ um den Faktor 2 induziert (Abb. 16).

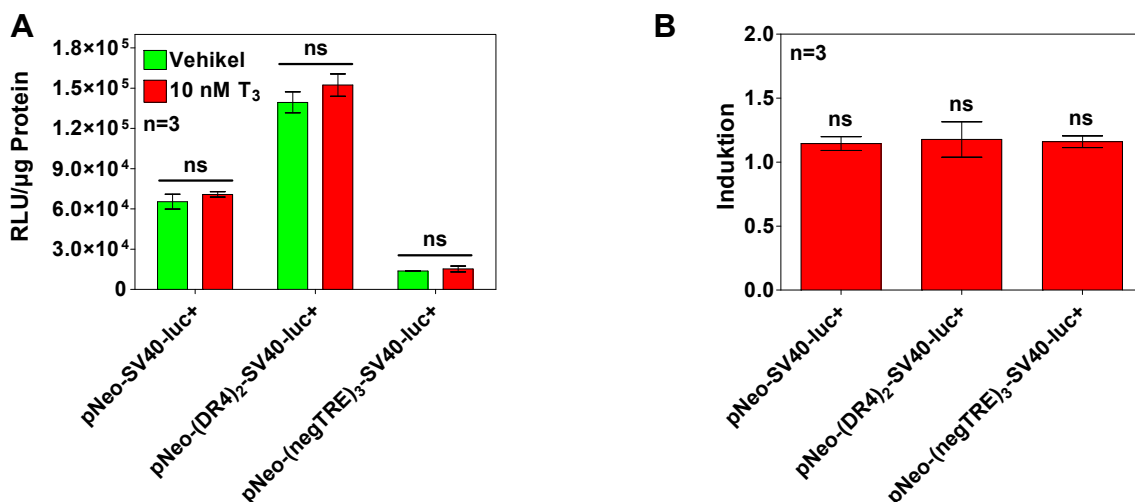


**Abb. 16: Vergleich der Reporterplasmide**

HepG2 Zellen wurden mit den unterschiedlichen Plasmiden transfiziert und 24 h nach der Transfektion für 24 h mit 10 nM T<sub>3</sub> bzw. Vehikel (DMEM/F12 mit Phenolrot + 10 % FBS) inkubiert. Dann erfolgten die Zellernte, eine Proteinbestimmung und der Luciferase-Assay. In (A) wird die Luciferase-Aktivität als RLU/µg Protein dargestellt. In (B) wird die Induktion der Luciferase-Aktivität in Bezug auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle gezeigt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je 3 Replikaten ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte durch den Student's t-Test.

### 3.2.4 Test der pBK-RSV-basierten Reporterplasmide

Im Vorfeld der Etablierung von stabil transfizierten Reportergenerzellen wurden die pBK-RSV-basierten T<sub>3</sub>-Reportergenkonstrukte durch transiente Transfektionsexperimente getestet. Hierfür wurden 6 · 10<sup>5</sup> HepG2 Zellen pro Well in 12-Well Platten transferiert.



**Abb. 17: Vergleich der pBK-RSV-basierten Reporterplasmide**

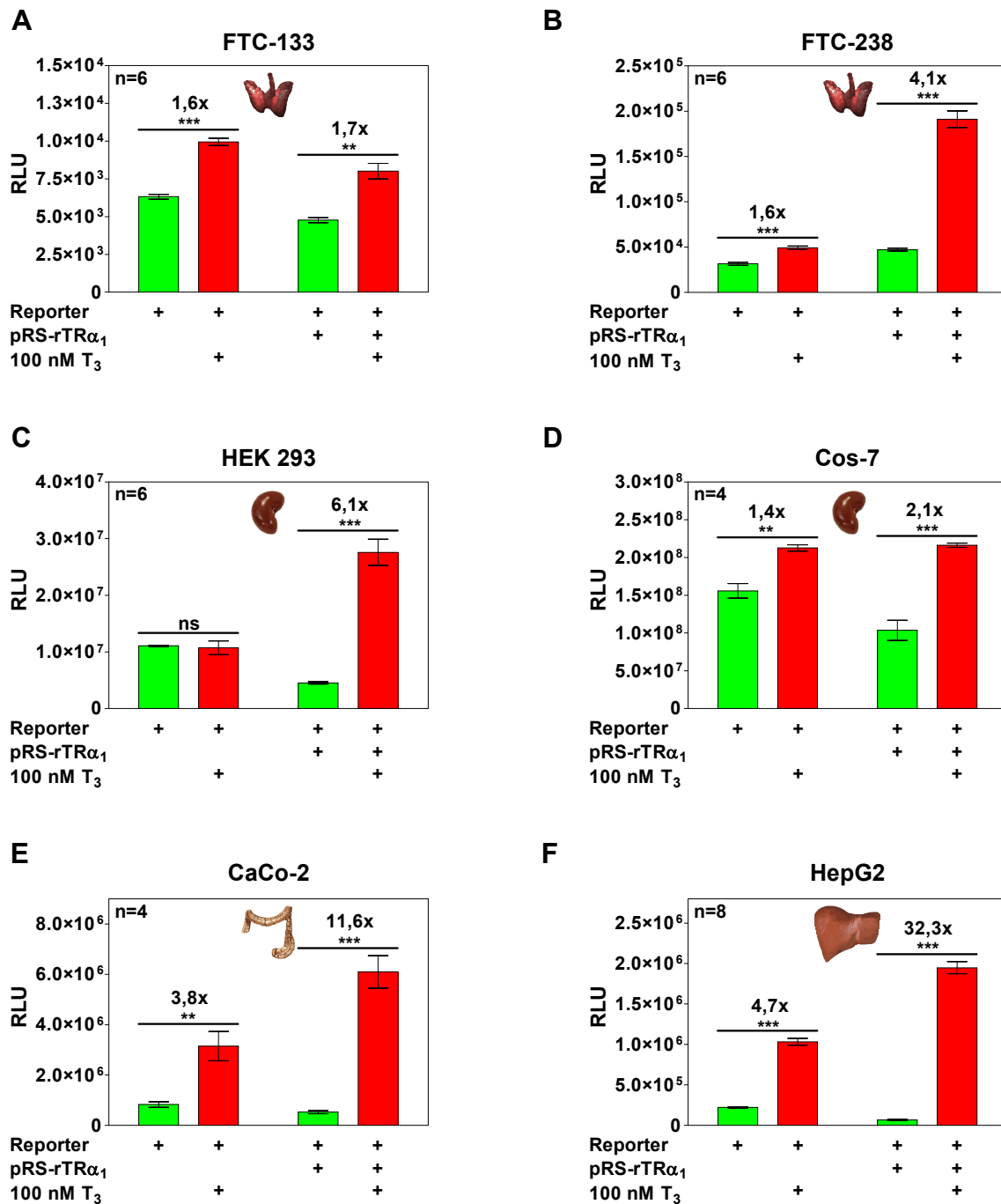
HepG2 Zellen wurden mit den unterschiedlichen Plasmiden transfiziert und 24 h nach der Transfektion für 24 h mit 10 nM T<sub>3</sub> bzw. Vehikel K (DMEM/F12 mit Phenolrot + 10 % FBS) inkubiert. Dann erfolgten die Zellernte, eine Proteinbestimmung und der Luciferase-Assay. In (A) wird die Luciferase-Aktivität als RLU/µg Protein dargestellt. In (B) wird die Induktion der Luciferase-Aktivität in Bezug auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle gezeigt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je 3 Replikaten ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte durch den Student's t-Test.

Am folgenden Tag erfolgte die Transfektion mit 1,5 µg Plasmid-DNA und 8 µL PolyFect pro Well. Nach einer Ruhephase von 24 h wurden die Zellen für 24 h in An- oder Abwesenheit von 10 nM T<sub>3</sub> in phenolrothaltigem DMEM/F12 + 10 % FBS inkubiert. Alle Inkubationsansätze wurden im Quadruplikat durchgeführt. Dann wurden die Zellen lysiert, die Luziferase-Aktivität bestimmt und eine Proteinbestimmung vorgenommen. Durch die Analyse mittels Student's T-test konnte keine statistisch signifikante T<sub>3</sub>-Responsivität der getesteten Plasmide festgestellt werden (Abb. 17).

### 3.2.5 Vergleich von Zelllinien

Um eine geeignete Zelllinie als Modellsystem für den Schilddrüsenhormon-Reporterassay zu finden, wurden verschiedene Zelllinien nur mit dem Reportergenkonstrukt p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ allein transfiziert oder es wurden Kotransfektionen mit p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ und einem TR-Expressionsplasmid (pRS-rTR $\alpha_1$ ) durchgeführt. Hierfür wurden 6·10<sup>5</sup> HepG2 Zellen pro Well in 12-Well Platten ausgesät und am kommenden Tag mit 1,5 µg DNA und 8 µL PolyFect pro 12-Well transfiziert. Nach 24 h wurden die so transfizierten Zellen mit serumfreiem Kulturmedium (DMEM mit Phenolrot für 293 und Caco-2, DMEM/F12 mit Phenolrot für FTC-133, FTC-238, HepG2) gewaschen, um die Konzentration von aus dem Serum stammenden Schilddrüsenhormonen zu reduzieren. Dann wurden die Zellen für 24 h in Gegenwart oder Abwesenheit von 100 nM T<sub>3</sub> in dem jeweiligen serumfreien, phenolrothaltigen Kulturmedium inkubiert. Alle Ansätze wurden mit mindestens 4 Replikaten durchgeführt. Weitere 24 h später erfolgten Luziferase-Assays. In Ansätzen mit Einzeltransfektion des Reportergenplasmids wurden in HEK 293 Zellen keine Änderungen der basalen Luziferase-Aktivität durch Applikation von 100 nM T<sub>3</sub> gemessen, in FTC-133 und FTC-238 wurde eine 1,6-fache Induktion und in HepG2 Zellen eine 4,7-fache Induktion bestimmt (Abb. 18). Durch Kotransfektion mit pRS-rTR $\alpha_1$  konnte in allen Zelllinien die T<sub>3</sub>-Responsivität erhöht werden. In der Schilddrüsen-Zelllinie FTC-133 waren mit 1,7-fach bei Kotransfektion mit pRS-rTR $\alpha_1$  die geringsten Induktionen durch T<sub>3</sub> zu verzeichnen (Abb. 18A). Auch mit Cos-7 wurden nur geringe Induktionen von 2,1-fach mit pRS-rTR $\alpha_1$ -Kotransfektion erreicht (Abb. 18D). Bei Kotransfektion wurden in FTC-238 4,1-fache, in 293 eine 6,1-fache, in Caco-2 eine 11,6-fache und in HepG2 eine 32,3-fache Induktionen gemessen (Abb. 18B, C, E, F). Es wurden noch weitere Zellen getestet (CHO-K1, CV1, ML1, HeLa, GH-3), die intermediäre Ergebnisse erzielten und hier nicht gezeigt werden.

## ERGEBNISSE

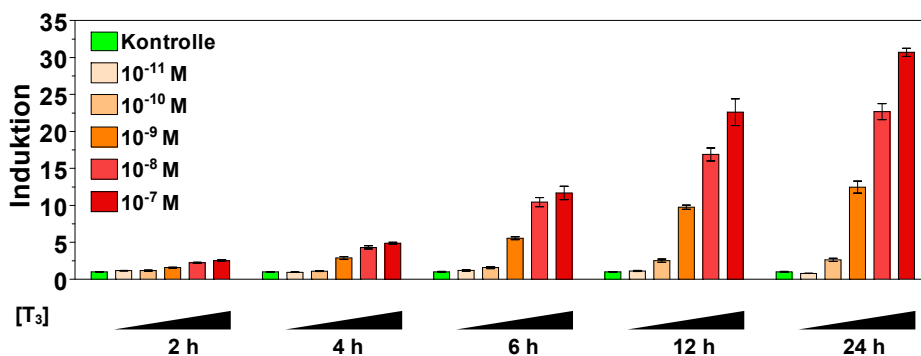


**Abb. 18: Suche nach geeigneten Zellen für das T<sub>3</sub>-Reportersystem**

Verschiedene humane Zelllinien (follikuläre Schilddrüsenkarzinomzellen FTC-133 (A) und FTC-238 (B), humane embryonale Nierenzellen HEK 293 (C), humane Hepatokarzinomzellen HepG2 (F), humane Colonkarzinomzelle Caco-2 (E)) und die renale Affen-Zelllinie Cos-7 (D) wurden nur mit p(DR4)<sub>2x</sub>-SV40-*luc*<sup>+</sup> (Reporter) einzeln transfiziert oder mit einer Kombination aus dem Reporterplasmid und dem TR-Expressionsplasmid pRS-rTR $\alpha_1$  kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h in Gegenwart oder Abwesenheit von 100 nM T<sub>3</sub> (rote Säulen) bzw. der Lösungsmittelkontrolle (grüne Säulen) inkubiert. Daraufhin wurde die Luciferase-Aktivität gemessen. Die Art der Transfektion sowie die Inkubation mit T<sub>3</sub> wird unter der Abszisse durch ein Pluszeichen (+) angezeigt. Zusätzlich zu den gemessenen RLU sind die Induktionsfaktoren der Luciferase-Aktivitäten in Bezug auf die Basalwerte der jeweiligen Lösungsmittelkontrollen über den verglichenen Säulen dargestellt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je mindestens 4 Replikaten  $\pm$  SEM. Die statistische Analyse erfolgte durch den Student's t-Test.

### 3.2.6 Zeitabhängigkeit der $T_3$ -Dosis-Wirkung in HepG2

Zur Ermittlung des optimalen Zeitfensters der  $T_3$ -Wirkung in HepG2 Zellen wurden Zeitreihenexperimente durchgeführt. Dafür wurden  $1,2 \cdot 10^7$  Zellen in einer T75 Zellkulturflasche mit DMEM/F12 + 10 % FBS kultiviert und nach 24 h mit  $22,5 \mu\text{g}$   $p(\text{DR4})_2\text{-SV40-luc+}$  und  $7,5 \mu\text{g}$   $p\text{RS-rTR}\alpha_1$  transfiziert. Nach 8 h wurden  $1 \cdot 10^5$  der transfizierten Zellen pro Well in sterile 96-Well Lumineszenzplatten transferiert. Weitere 16 h später wurde jeweils ein Teil der Zellen in Quadruplikaten für 24 h, 12 h, 6 h, 4 h oder 2 h mit steigenden  $T_3$ -Konzentrationen von  $10^{-11}$  bis  $10^{-7}$  M inkubiert, sodass die Zellen aller Zeitpunkte am nächsten Tag gleichzeitig lysiert werden konnten. Dann wurden Luziferase-Assays durchgeführt. Bereits nach 2 h war eine dosisabhängige Induktion des Reportergenplasmids zu messen (Abb. 19). Die stärkste Induktion lag bei ca. 2,5x mit 100 nM  $T_3$ . Je länger die Zellen mit  $T_3$  inkubiert worden waren, desto größer waren die Luziferase-Aktivitäten. Mit 100 nM  $T_3$  wurde nach 4 h eine ca. 5-fache Induktion erzielt, nach 6 h eine 12-fache, nach 12 h eine 23-fache und nach 24 h wurde mit ca. 31-fach die höchste Induktion gemessen.



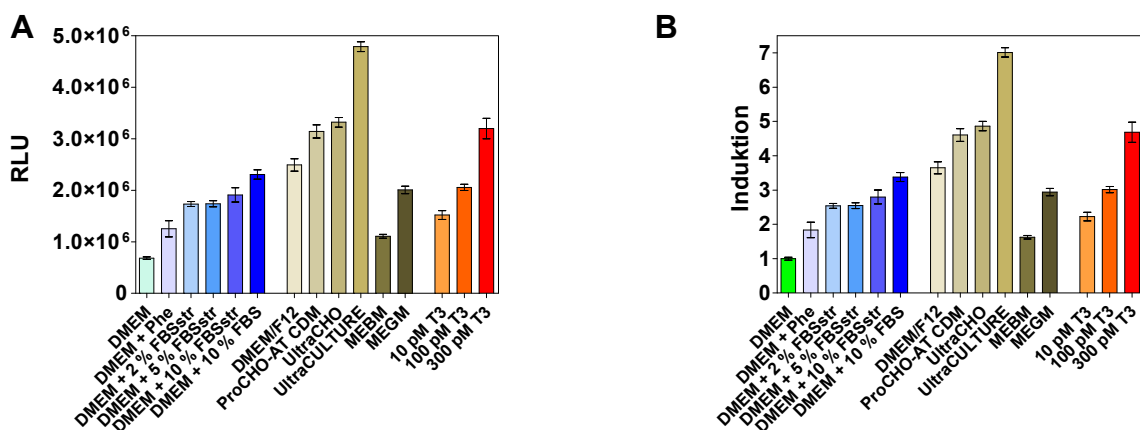
**Abb. 19:  $T_3$ -Dosis-Wirkungskurve im Zeitverlauf**

HepG2 Zellen wurden in einer T75 Zellkulturflasche mit  $22,5 \mu\text{g}$   $p(\text{DR4})_2\text{-SV40-luc+}$  und  $7,5 \mu\text{g}$   $p\text{RS-rTR}\alpha_1$  kotransfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiten (2 h, 4 h, 6 h, 12 h oder 24 h) mit steigenden  $T_3$ -Konzentrationen von  $10^{-11}$  bis  $10^{-7}$  M inkubiert und im Anschluss wurde die Luziferase-Aktivität gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je 4 Replikaten  $\pm$  SEM.



### 3.2.7 Effekte von Kulturmedium auf den Reporterassay

Zur Minimierung der Hintergrundinduktion des Reportergenplasmids durch Medienkomponenten wurden unterschiedlich supplementierte oder nicht-supplementierte Basalmedien und spezielle serumfreie sowie chemisch definierte Medien verglichen. Hierfür wurden  $2,4 \cdot 10^7$  HepG2 in T150 Zellkulturflaschen ausgesät und nach 24 h unter Verwendung von 300  $\mu$ L PolyFect mit 45  $\mu$ g p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ und 15  $\mu$ g pRS-rTR $\alpha_1$  transfiziert. Nach dem Transfer von je  $10^5$  der so transfizierten Zellen pro Well in eine sterile 96-Well Lumineszenzmessplatte wurden die Zellen für 24 h in je 4 Replikaten mit Medien unterschiedlicher Zusammensetzung inkubiert. Dann erfolgte ein Luziferase-Assay. Die geringsten Werte wurden bei der Inkubation mit nicht-supplementiertem DMEM beobachtet (Abb. 20A). Relativ zur den mit DMEM erzielten RLU wurden unter Verwendung von DMEM, welches mit hormonreduziertem („gestripptem“) FBS supplementiert worden war, 2,8-fach höhere RLU gemessen. Dabei hatte eine Erniedrigung der Supplementation von 10 % hormongestripptem FBS auf 5 % oder 2 % nur einen marginalen Effekt. Bei Zusatz von 10 % nicht-gestripptem FBS erhöhten sich die Messwerte minimal im Vergleich zu gestripptem FBS und entsprachen in etwa den Werten, die mit 100 pM T<sub>3</sub> in DMEM und dem serumfreien MEGM gemessen wurden. Das chemisch definierte ProCHO-AT CDM und das serumfreie Spezialmedium UltraCHO erbrachten RLU, die denen mit 300 pM T<sub>3</sub> in DMEM entsprachen und lagen somit noch höher als die Werte bei DMEM mit Serumzusatz. Mit UltraCULTURE waren die höchsten RLU zu verzeichnen, die ca. 7-fach höher waren als die DMEM-Werte (Abb. 20B).



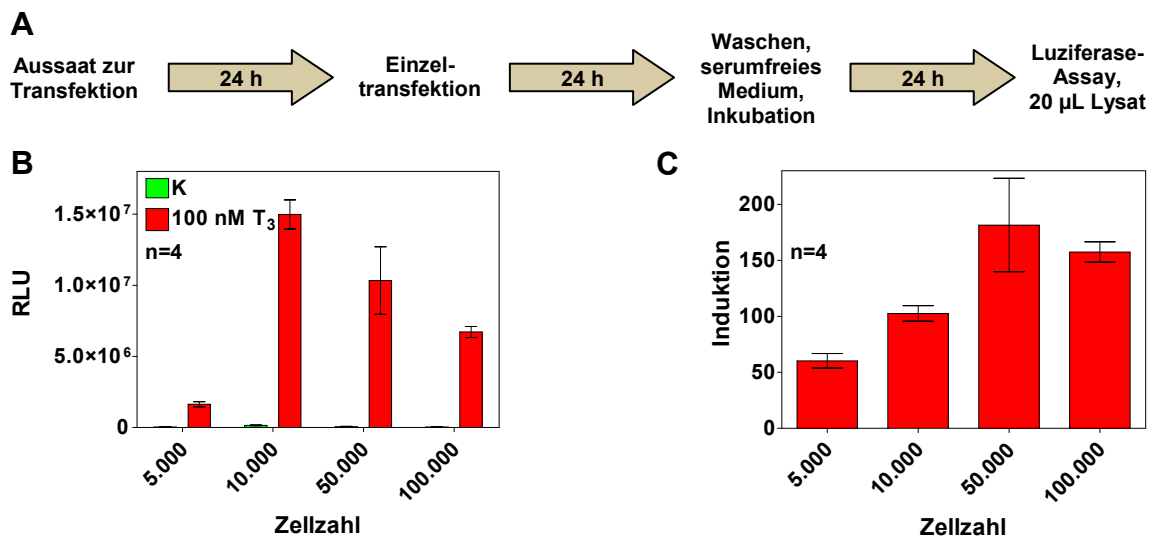
**Abb. 20: Hintergrundaktivität von Medien**

HepG2 Zellen wurden mit 15  $\mu$ g pRS-rTR $\alpha_1$ , 45  $\mu$ g p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ und 300  $\mu$ L PolyFect in einer T150 Kulturflasche transfiziert. Nach 8 h wurden die  $5 \cdot 10^4$  Zellen pro Well in DMEM/F12 + 10 % FBS in 96-Well Lumineszenzmessplatten überführt. Weitere 16 h später wurden die Zellen für 30 min in DMEM vorinkubiert und bis zum Luziferase-Assay für 24 h mit den angegebenen Medien inkubiert. In (A) ist die Aktivität des T<sub>3</sub>-Reportergens in RLU dargestellt und in (B) werden die Induktionen der Luziferase relativ zu DMEM gezeigt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je 4 Replikaten  $\pm$  SEM.

Lediglich das nicht-supplementierte serumfreie MEBM erzielte Hintergrundwerte, die nur 1,6-fach höher waren als bei Ansätzen mit DMEM.

### 3.2.8 Einfluss der Zellzahl bei Transfektion in 96-Well

Zur Ermittlung, welche HepG2-Zellzahl optimale Ergebnisse in 96-Well-Transfektionen erzielt, wurden 5.000, 10.000, 50.000 und 100.000 HepG2 Zellen pro Well am Tag vor der Transfektion in 96-Well Platten eingesetzt. Einen Tag nach der Kotransfektion von 112,5 ng p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*<sup>+</sup> und 37,5 ng pRS-rTR $\alpha_1$  mit 1  $\mu$ L PolyFect pro Well wurden die Zellen mit je 4 Replikaten in An- oder Abwesenheit von 100 nM T<sub>3</sub> inkubiert und nach weiteren 24 h erfolgte der Luziferase-Assay (Abb. 21A). Die höchsten RLU wurden mit  $1 \cdot 10^4$  Zellen erreicht (Abb. 21B) und die größte Induktion mit  $5 \cdot 10^4$  pro Well (Abb. 21C).



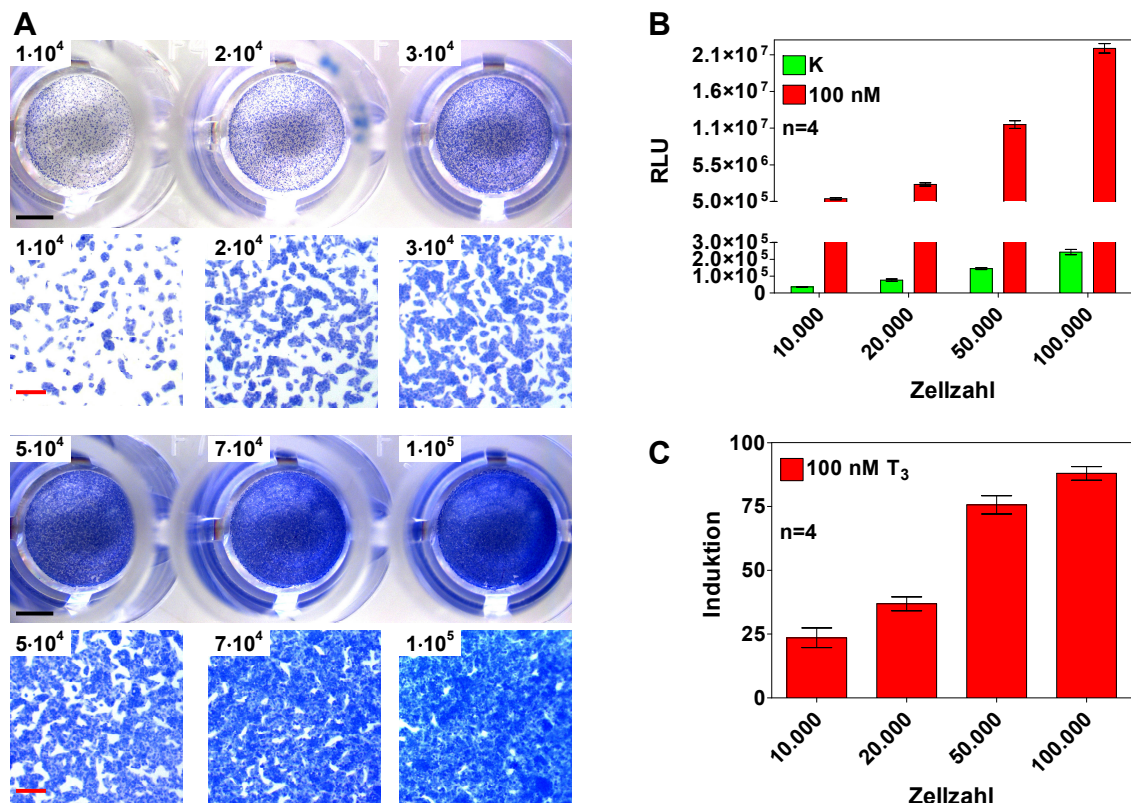
**Abb. 21: Ermittlung der optimalen HepG2-Zellzahl zur Transfektion im 96-Well Maßstab**  
 Schema des experimentellen Ablaufs für nachfolgende Experimente (A). HepG2 Zellen wurden in unterschiedlichen Dichten in 96-Well Lumineszenzmessplatten ausgesät um am folgenden Tag mit 112,5 ng p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*<sup>+</sup>, 37,5 ng pRS-rTR $\alpha_1$  und 1  $\mu$ L PolyFect pro Well kotransfiziert. Einen Tag später erfolgte ein Waschschrift mit DMEM und die Inkubation +/- 100 nM T<sub>3</sub> für 24 h und darauf ein Luziferase-Assay. In (B) ist die relative Luziferase-Aktivität als RLU dargestellt. (C) zeigt die Induktion der Luziferase-Aktivität in Bezug auf die jeweilige Lösungsmittelkontrolle. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je 4 Replikaten  $\pm$  SEM.

### 3.2.9 Bestimmung der optimalen Zellzahl/96-Well bei Pooltransfektionen

Im Rahmen von Pooltransfektionen beim ED-Screening wurden die Zellen 8 h nach der Transfektion in der großvolumigen Zellkulturflasche in sterile 96-Well Lumineszenzmessplatten transferiert und nach weiteren 16 h für 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Zur Ermittlung, mit welcher Anzahl transfizierter HepG2 Zellen pro 96-Well optimale Ergebnisse erzielt werden, wurden  $3,9 \cdot 10^6$  Zellen in eine

## ERGEBNISSE

T25 Zellkulturflasche überführt und nach einem Tag mit 3 µg p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+, 1 µg pRS-rTRα<sub>1</sub> und 20 µL PolyFect transfiziert. Nach 8 h wurden 10.000, 20.000, 50.000, oder 100.000 transfizierte Zellen pro 96-Well eingesät, für 24 h mit 100 nM T<sub>3</sub> vorinkubiert und im Luziferase-Assay verglichen. Alle Ansätze wurden in Quadruplikaten durchgeführt. Zur Veranschaulichung der optischen Zelldichten wurden die Zellen eines Parallelansatzes zum Zeitpunkt der Lyse für den Luziferase-Assay nach Permeabilisierung durch Triton X-100 mit Trypanblau gefärbt (Abb. 22A). Die optische Konfluenz wurde zu diesem Zeitpunkt in Ansätzen mit 100.000 Zellen erreicht.



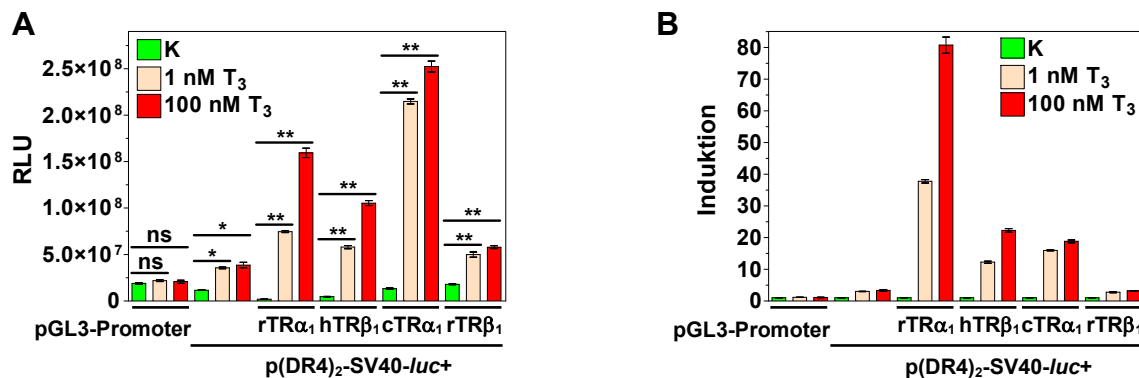
**Abb. 22: Ermittlung der optimalen HepG2-Zellzahl pro 96-Well nach Pooltransfektion**

HepG2 Zellen wurden in einer T25 Flasche mit 3 µg p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+, 1 µg pRS-rTRα<sub>1</sub> und 20 µL PolyFect kotransfiziert und nach 8 h in unterschiedlichen Zelldichten in sterile 96-Well Lumineszenzmessplatten bzw. transparente Zellkulturplatten überführt. Einen Tag später erfolgte die Inkubation +/- 100 nM T<sub>3</sub> für 24 h und darauf ein Luziferase-Assay. In (A) sind zur Veranschaulichung der optischen Zelldichte permeabilisierte und Trypanblau-gefärbte HepG2 Zellen abgebildet. In der ersten und dritten Reihe sind Übersichtsaufnahmen der gesamten Wells dargestellt und in Reihe 2 und 4 sind Vergrößerungen der darüber gezeigten Wells abgebildet. Die Zellzahlen sind oben links in die Abbildungen eingetragen. Die schwarzen Maßstabsbalken der Übersichtsaufnahmen entsprechen 2 mm und die roten der Vergrößerungen 150 µm. (B) zeigt die gemessenen RLU für in verschiedenen Zelldichten eingesetzte transfizierte HepG2 Zellen und (C) die entsprechenden Induktionen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Im Diagramm (B) wurde ein Achsenbruch der Ordinate verwendet, um auch den Einfluss der Zellzahl auf die relativ zur jeweiligen T<sub>3</sub>-Inkubation niedrigen Werte der Lösungsmittelkontrollen K beurteilen zu können. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je 4 Replikaten ± SEM.

Auch in Bezug auf die RLU und die Induktion im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wurden in Ansätzen mit 100.000 eingesetzten Zellen die Maxima dieses Experiments gemessen (Abb. 21B und C).

### 3.2.10 Vergleich unterschiedlicher TR

In Säugetieren codieren die beiden Gene *THRA* und *THRB* für verschiedene TR-Isotypen und -formen von denen die physiologische Relevanz für TR $\alpha_1$  und TR $\beta_1$  und TR $\beta_2$  am besten charakterisiert ist. In diesem Experiment wurde der Einfluss einer Kotransfektion des Reportergenplasmids p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ mit unterschiedlichen Expressionsplasmiden für TR untersucht. Hierzu wurden je 10<sup>5</sup> HepG2 Zellen pro Well einer sterilen 96-Well Lumineszenzmessplatte transferiert. Am nächsten Tag erfolgten Einzeltransfektionen mit 112,5 ng p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ und 37,5 ng pRS-rTR $\alpha_1$ , prTR $\beta_1$ , pRS-hTR $\beta_1$  oder pcTR $\alpha_1$  mithilfe von 1  $\mu$ L PolyFect pro Well. Bei Zellen, die nicht mit TR-Expressionsplasmiden kotransfiziert (pGL3-Promoter und eine p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ Transfektion) wurden, wurde ein Leerplasmid (pGEM) als Ersatzplasmid für die TR-Expressionsplasmide verwendet, um die Gesamt-DNA-Menge zwischen den Transfektionsansätzen konstant zu halten. Die Zellen wurden 24 h später in DMEM vorinkubiert und nach Mediumwechsel mit je 4 Replikaten pro Ansatz in An- oder Abwesenheit von 100 nM T<sub>3</sub> inkubiert.



**Abb. 23: Vergleich von TR-Expressionsplasmiden**

HepG2 Zellen wurden in einer Dichte von 1·10<sup>5</sup> Zellen pro Well in eine 96-Well Lumineszenzmessplatte ausgesät. Am Tag darauf wurden die Zellen mit den angegebenen unterschiedlichen Plasmidkombinationen transfiziert (112,5 ng Reportergenplasmid + 37,51 ng TR-Expressionsvektor bzw. pGEM-Leervektor zum Konstanthalten der Gesamt-DNA-Menge + 1  $\mu$ L PolyFect pro Well). Dann wurden sie in An- oder Abwesenheit von 1 bzw. 100 nM T<sub>3</sub> für 24 h inkubiert und die Luciferase-Aktivität bestimmt. In (A) wird die relative Luciferase-Aktivität in RLU dargestellt und in (B) werden die Induktionen relativ zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle gezeigt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je 4 Replikaten  $\pm$  SEM. Der statistische Vergleich der Gruppen mit der jeweiligen Kontrollgruppe erfolgte mittels ANOVA gefolgt von Dunnett-Test.

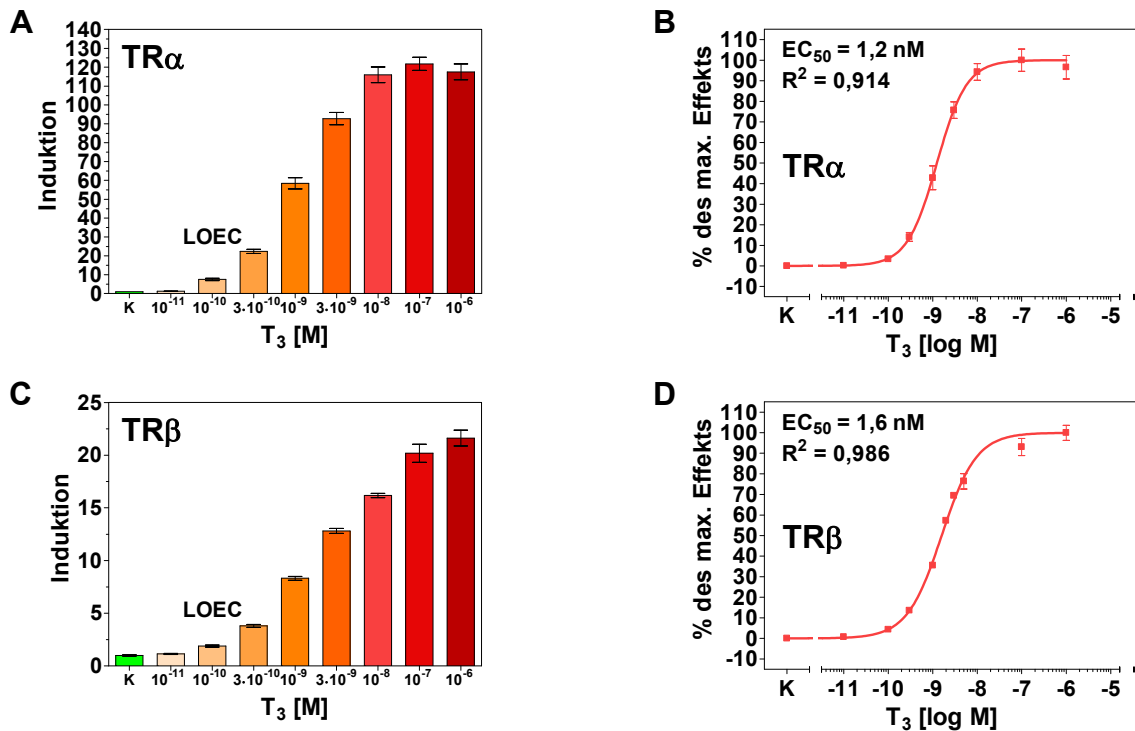
Im folgenden Luziferase-Assay wurde bei Transfektion des Leervektors pGL3-Promoter keine statistisch signifikante Induktion durch  $T_3$  festgestellt (ANOVA, Dunnett-Test), während bei Kotransfektion mit pCTR $\alpha_1$  eine signifikante Induktion durch  $T_3$  mit der höchsten RLU, gefolgt von pRS-rCTR $\alpha_1$  und pRS-hCTR $\beta_1$  gemessen wurde (Abb. 23A). Die Kotransfektion mit pCTR $\beta_1$  erzielte RLU, die nur gering über dem Niveau der Einzeltransfektion mit p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-luc+ lagen ( $3,9 \cdot 10^7$  bzw.  $5,8 \cdot 10^7$ ). Die RLU der Lösungsmittelkontrollen zu rCTR $\alpha_1$ - und hCTR $\beta_1$ -Kotransfektion ( $2 \cdot 10^6$  und  $4,7 \cdot 10^6$ ) sind im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle der Einzeltransfektion mit p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-luc+ ( $1,2 \cdot 10^7$ ) deutlich niedriger, wohingegen die entsprechenden Werte bei Kotransfektion mit cCTR $\alpha_1$  und rCTR $\beta_1$  ( $1,3 \cdot 10^7$  und  $1,8 \cdot 10^7$ ) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle der Einzeltransfektion erhöht sind (Abb. 23A). Die stärksten Induktionen relativ zur Lösungsmittelkontrolle wurden bei Kotransfektion mit rCTR $\alpha_1$  (81-fach) beobachtet (Abb. 23B). Mit hCTR $\beta_1$  wurden Induktionen von 22-fach und mit cCTR $\alpha_1$  von 19-fach erreicht. Die Induktionen bei Kotransfektion mit rCTR $\beta_1$  entsprechen denen des Reporterplasmids alleine (3,3x).

Auch in anderen Zelllinien (Caco-2, Cos-7) waren durch Kotransfektion mit rCTR $\alpha_1$  die stärksten Induktionen zu beobachten (nicht gezeigt).

### 3.2.11 $T_3$ -Dosis-Wirkungskurven nach optimiertem Protokoll

Die bisher beschriebenen Erkenntnisse zur Optimierung des Reporterassays sind in alle nachfolgenden Experimente eingeflossen. Zur Pooltransfektion in T75 Zellkulturflaschen wurden  $1,2 \cdot 10^7$  HepG2 Zellen in DMEM/F12 + 10 % FBS pro Flasche ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 22,5  $\mu$ g p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-luc+ und 7,5  $\mu$ g pRS-rCTR $\alpha_1$  (Abb. 15 A, B) oder pRS-hCTR $\beta_1$  (Abb. 15 C, D) unter Verwendung von 150  $\mu$ L PolyFect transfiziert. Nach 8 h wurden je  $1 \cdot 10^5$  Zellen pro Well in eine sterile 96-Well Lumineszenzmessplatte überführt. Nach einer Ruhephase von 16 h wurden die Zellen für 1 h bei Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in phenolrotfreiem DMEM ohne Zusätze vorinkubiert. Dann wurde das Medium gegen frisches Zusatz-freies DMEM ausgetauscht. Die Zellen wurden in Quadruplikaten für 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle bzw. steigenden  $T_3$ -Konzentrationen inkubiert. Darauf erfolgten Zellyse und Luziferase-Assays. So wurden bei erfolgter rCTR $\alpha_1$ -Transfektion für die folgenden Experimente typische sigmoidale  $T_3$ -Dosis-Wirkungskurven mit Maximalinduktionen von über 100-fach und EC<sub>50</sub>-Werten von ca. 1 nM erreicht (Abb. 24 A, B). Die Dosis-Wirkungskurven für hCTR $\beta_1$ -Transfektion wiesen unter diesen Bedingungen Maximalinduktionen von über 20-fach und ebenfalls übereinstimmende EC<sub>50</sub>-Werte von 1-2 nM auf (Abb. 24 C, D). Durch statistische Analyse mittels ANOVA

gefolgt von Dunnett-Test wurde sowohl für das rTR $\alpha_1$ - als auch für das hTR $\beta_1$ -System eine minimale effektive Konzentration (LOEC, *lowest observed effect concentration*) von  $10^{-10}$  M T $_3$  bestimmt.



**Abb. 24: T $_3$ -Dosis-Wirkungskurven in HepG2 Zellen nach optimiertem Protokoll**

Je  $1,2 \cdot 10^7$  HepG2 Zellen wurden in DMEM/F12+10 % FBS auf T75 Zellkulturflaschen verteilt. Am folgenden Tag wurden die Zellen unter Verwendung von 150  $\mu$ L PolyFect mit 22,4  $\mu$ g p(DR4) $_2$ -SV40-*luc*+ und 7,5  $\mu$ g pRS-rTR $\alpha_1$  (A, B) oder 7,5  $\mu$ g pRS-hTR $\beta_1$  (C, D) pro T75 Zellkulturflasche transfiziert. Nach 8 h wurden je  $1 \cdot 10^5$  Zellen pro Well einer sterilen 96-Well Lumineszenzmessplatte ausgesät und für 18 h ruhen gelassen. Dann wurden die Zellen zum Waschen für 1 h in DMEM ohne Phenolrot und ohne weitere Zusätze bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte ein Mediumwechsel gegen frisches DMEM ohne Zusätze und die Inkubation mit steigenden Konzentrationen von T $_3$  bzw. mit der Lösungsmittelkontrolle. Weitere 24 h später wurden Luziferase-Assays durchgeführt. In (A) und (C) wird die Induktion der Luziferase in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle gezeigt. In (B) und (D) werden die entsprechenden Dosis-Wirkungskurven mit den EC $_{50}$ -Werten dargestellt. Die Dosis-Wirkungskurven und die EC $_{50}$ -Werte wurden mit der Funktion „sigmoidal dose-response“ der Software GraphPad Prism 4 berechnet. In (A) und (B) werden die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten mit Quadruplikaten  $\pm$  SEM dargestellt. Die Daten in (C) und (D) repräsentieren die Mittelwerte von je 4 Replikaten  $\pm$  SEM. Der statistische Vergleich der unterschiedlichen Konzentrationsstufen mit der Kontrollgruppe erfolgte durch ANOVA mit Dunnett-Test. Die niedrigste statistisch signifikante Induktion durch T $_3$  (LOEC) wurde für beide TR bei  $10^{-10}$  nM T $_3$  ermittelt.

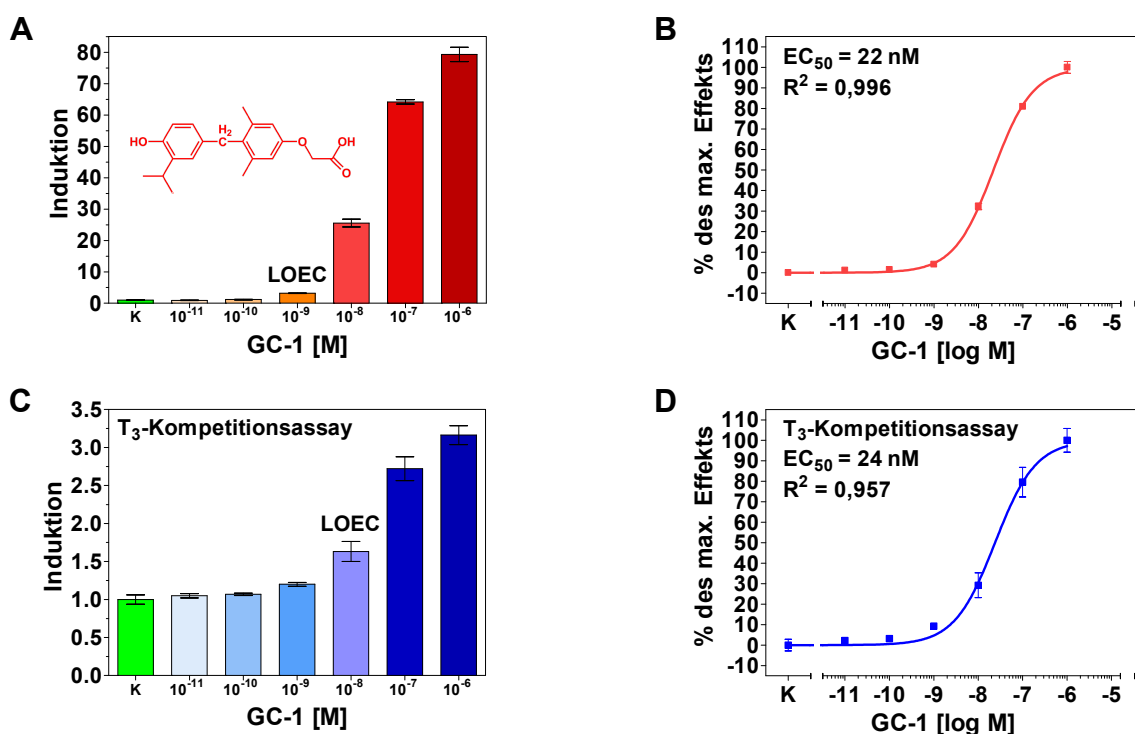
### 3.2.12 Validierung mit dem synthetischen T $_3$ -Agonisten GC-1

Zur Validierung des Systems und zur Charakterisierung von agonistischen Effekten in diesem Testsystem wurde die Dosis-Wirkung des synthetischen TR-Agonisten GC-1 untersucht (Chiellini et al. 1998). HepG2 Zellen wurden in einer Dichte von  $1,2 \cdot 10^7$  Zellen pro T75 Flasche ausgesät und am folgenden Tag mit 22,5  $\mu$ g



## ERGEBNISSE

p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*<sup>+</sup> und 7,5 µg pRS-rTR $\alpha_1$  transfiziert. Die Zellen wurden 8 h später zu je 1·10<sup>7</sup> Zellen pro Well in 96-Well Lumineszenzplatten transferiert. Um die Einzeleffekte von GC-1 auf das Reportergensystem zu analysieren, wurden die Zellen nach 16 h für die folgenden 24 h mit steigenden Konzentrationen von GC-1 inkubiert. Durch eine Koinkubation von steigenden GC-1 Konzentrationen mit 1 nM T<sub>3</sub> sollten Erkenntnisse über das Verhalten des Reportergensystems bei der Konkurrenz eines TR-Agonisten mit T<sub>3</sub> gewonnen werden. Dadurch sollte die spätere Interpretation von Daten aus T<sub>3</sub>-Kompetitionsassays erleichtert werden. Alle Ansätze wurden mit 4 Replikaten durchgeführt. Dann erfolgte der Luziferase-Assay. Bei Einzelapplikation vermochte es GC-1, die Luziferase-Aktivität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle um das 80-fache zu steigern (Abb. 25A).



**Abb. 25: Dosis-Wirkungskurve von GC-1 in rTR $\alpha_1$ -kotransfizierten HepG2**

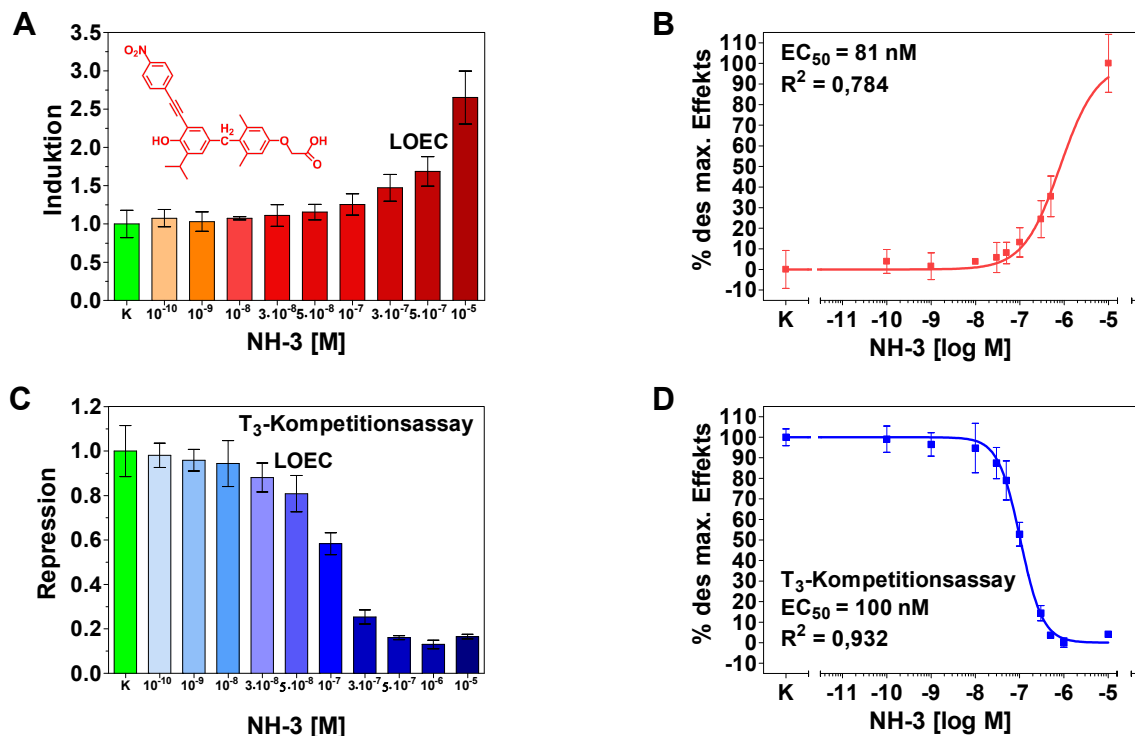
In eine T75 Zellkulturflasche wurden 1,2·10<sup>7</sup> HepG2 Zellen ausgesät und über Nacht kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 22,5 µg p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*<sup>+</sup> und 7,5 µg pRS-rTR $\alpha_1$  kotransfiziert. Nach 8 h wurden je 1·10<sup>5</sup> der transfizierten Zellen pro Well in eine 96-Well Platte überführt und für 16 h im Inkubator inkubiert. Die Zellen wurden dann für 1 h in DMEM ohne Zusätze im Inkubator vorinkubiert, dann folgte ein Mediumwechsel gegen frisches DMEM und die Inkubation mit steigenden Konzentrationen von GC-1 (A, B) und der Lösungsmittelkontrolle. Alle Ansätze für Kompetitionsassays wurden koinkubiert mit 1 nM T<sub>3</sub>, das auch der Lösungsmittelkontrolle beigelegt wurde (C, D). Nach 24 h wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt. In (A) sind die chemische Struktur von GC-1 sowie die Induktion durch verschiedene GC-1 Konzentrationen dargestellt. Ab 10<sup>-9</sup> nM sind statistisch signifikante Induktionen zu messen. (B) zeigt die Dosis-Wirkungskurve von GC-1. Die Induktionen von GC-1 bei Konkurrenz mit 1 nM T<sub>3</sub> sind in (C) und die zugehörige Dosis-Wirkungskurve in (D) abgebildet. Die sigmoidalen Dosis-Wirkungskurven und die EC<sub>50</sub>- bzw. IC<sub>50</sub>-Werte wurden mit der Funktion „sigmoidal dose-response“ der Software GraphPad Prism 4 berechnet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je mindestens 4 Replikaten ± SEM und die statistische Analyse erfolgte durch ANOVA gefolgt von Dunnett-Test.

Die Dosis-Wirkungskurve von GC-1 hat im TR $\alpha$ -Reportergensystem ein EC<sub>50</sub>-Wert von 22 nM (Abb. 25B). Ab einer Konzentration von 1 nM wurden statistisch signifikante Induktionen gegenüber der Lösungsmittelkontrolle gemessen (ANOVA, Dunnett-Test). Im T<sub>3</sub>-Kompetitionsassay wurde ein EC<sub>50</sub>-Wert von 24 nM ermittelt und es wurden Maximalinduktionen erreicht, die ca. 3-fach höher als die Induktionen durch 1 nM T<sub>3</sub> lagen (Abb. 25C, D). Eine statistisch signifikante Induktion des Reportergens (LOEC) wurde ab 10 nM GC-1, also ab einem 10-fachen molaren GC-1-Überschuss gegenüber T<sub>3</sub>, erreicht (Abb. 25C).

### 3.2.13 Validierung mit dem synthetischen T<sub>3</sub>-Antagonisten NH-3

Um die Effekte eines T<sub>3</sub>-Antagonisten in diesem System zu charakterisieren und das System zu validieren, wurde der synthetische T<sub>3</sub>-Antagonist NH-3 (Lim et al. 2002) verwendet. Hierzu wurden HepG2 Zellen in einer Dichte von  $1,2 \cdot 10^7$  Zellen pro T75 Flasche ausgesät und am folgenden Tag mit 22,5  $\mu$ g p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ und 7,5  $\mu$ g pRS-rTR $\alpha_1$  mithilfe von 150  $\mu$ L PolyFect transfiziert. Nach 8 h wurden je  $10^7$  transfizierte Zellen pro Well in sterile 96-Well Lumineszenzplatten transferiert. Die Zellen wurden nach 16 h für 1 h in supplementfreiem DMEM vorinkubiert. Dann wurden die Zellen in frischem DMEM für die folgenden 24 h mit steigenden Konzentrationen von NH-3 alleine oder mit NH-3 in Kombination mit 1 nM T<sub>3</sub> als Kompetitor inkubiert. In Konkurrenzexperimenten wurde der Lösungsmittelkontrolle (0,05 % DMSO in DMEM) 1 nM T<sub>3</sub> zugefügt. Alle Ansätze wurden mit 4 Replikaten durchgeführt. Dann erfolgten Luziferase-Assays und die statistische Analyse mittels ANOVA gefolgt von Dunnett-Test. In Einzelinkubationen wurden statistisch signifikante (LOEC) Induktionen des T<sub>3</sub>-Reportergens ab einer NH-3-Konzentration von 500 nM erreicht (Abb. 26A). Die Maximalinduktionen von 2,6-fach über der Lösungsmittelkontrolle wurden mit 10  $\mu$ M erzielt. Die berechnete Dosis-Wirkungskurve hatte einen EC<sub>50</sub>-Wert von 81 nM (Abb. 26B). Im T<sub>3</sub>-Kompetitionsexperiment wurde die T<sub>3</sub>-Reportergenaktivität ab 50 nM NH-3 ([T<sub>3</sub>]:[NH 3] = 1:50) signifikant reduziert (Abb. 26C). Die maximale Repression trat bei 1  $\mu$ M auf. Hier wurde die Reportergenaktivität auf 13 % der Lösungsmittelkontrolle reduziert. Die berechnete Dosis-Wirkungskurve von NH-3 hatte einen IC<sub>50</sub>-Wert von 100 nM (Abb. 26D).





**Abb. 26: Dosis-Wirkungskurve von NH-3 in rTR<sub>α1</sub>-kotransfizierten HepG2**

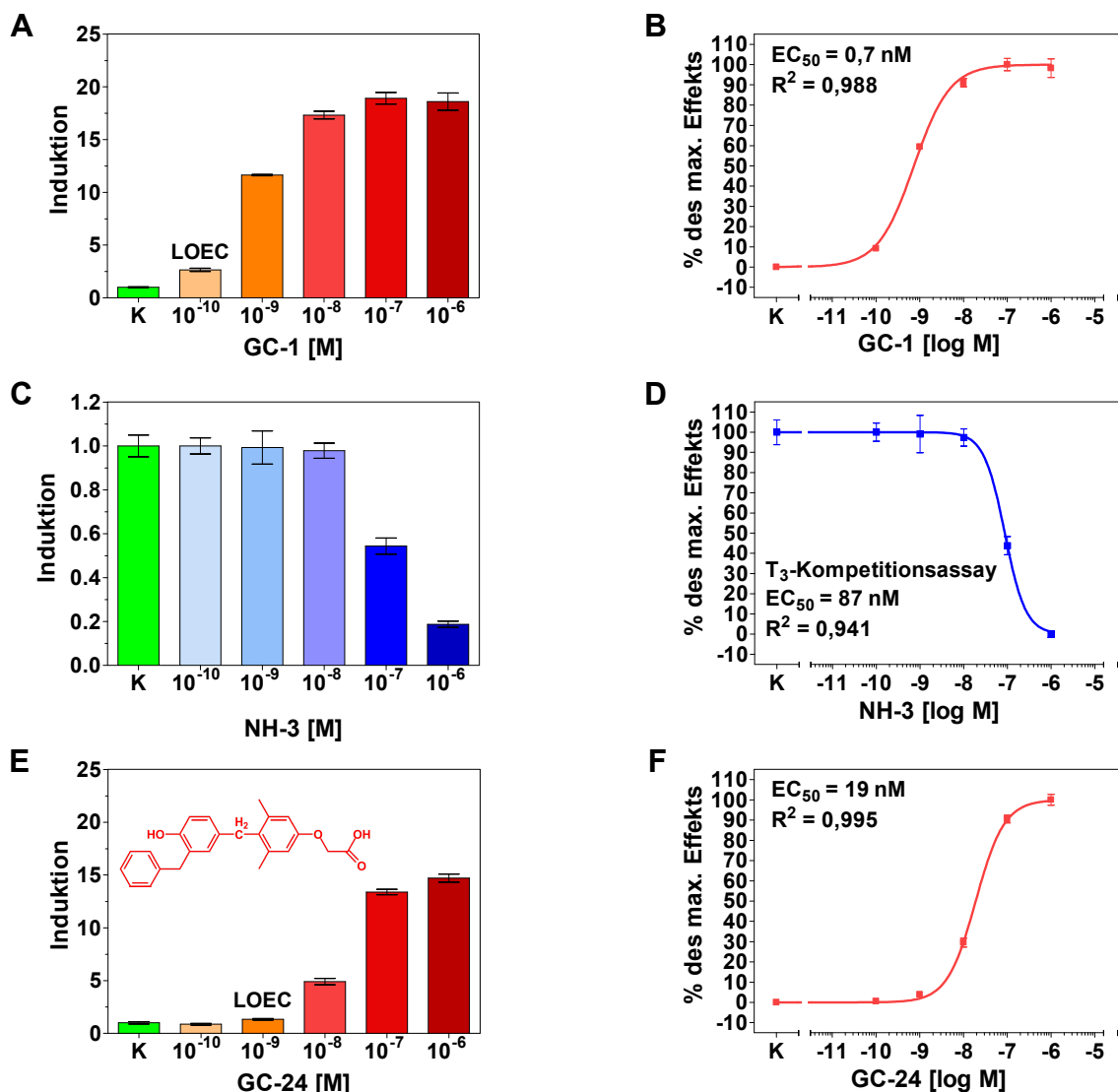
In eine T75 Zellkulturflasche wurden  $1,2 \cdot 10^7$  HepG2 Zellen ausgesät und über Nacht kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 22,5 µg p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ und 7,5 µg pRS-rTR<sub>α1</sub> kotransfiziert. Nach 8 h wurden je  $1 \cdot 10^5$  der transfizierten Zellen pro Well in eine 96-Well Platte überführt und für 16 h im Inkubator inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin für 1 h in DMEM ohne Supplemente im Inkubator vorinkubiert, dann folgte ein Mediumwechsel gegen frisches DMEM und die Inkubation mit steigenden Konzentrationen von NH-3 (A, B) und der Lösungsmittelkontrolle mit je 4 Replikaten. In Ansätzen für T<sub>3</sub>-Kompetitionsexperimente wurden NH-3 mit 1 nM T<sub>3</sub> koinkubiert (C, D). Nach 24 h wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt. In (A) ist die Induktion des T<sub>3</sub>-Reportergens durch NH-3 sowie die chemische Struktur von NH-3 dargestellt. Die Dosis-Wirkungskurve von NH-3 ist in (B) abgebildet. In (C) ist die Repression durch NH-3 in einem Kompetitionsexperiment mit 1 nM T<sub>3</sub> dargestellt und (D) zeigt die Dosis-Wirkungskurve dazu. Die sigmoidalen Dosis-Wirkungskurven und die EC<sub>50</sub>- bzw. IC<sub>50</sub>-Werte wurden mit der Funktion „sigmoidal dose-response“ der Software GraphPad Prism 4 berechnet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je mindestens 4 Replikaten ± SEM und die statistische Analyse erfolgte durch ANOVA gefolgt von Dunnett-Test.

### 3.2.14 Validierung mit GC-1, GC-24 und NH-3 im TR<sub>β</sub>-System

Die synthetischen TR-Agonisten GC-1 und GC-24 sowie der Antagonist NH-3 besitzen eine höhere Selektivität für TR<sub>β</sub> als für TR<sub>α</sub> (Chiellini et al. 1998; Borngraeber et al. 2003; Nguyen et al. 2005). Um dies in diesem Reportersystem zu überprüfen, wurden HepG2 Zellen in einer Dichte von  $1,2 \cdot 10^7$  Zellen pro T75 Flasche ausgesät und am folgenden Tag mittels 150 µL PolyFect mit 22,5 µg p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ und 7,5 µg pRS-hTR<sub>β1</sub> transfiziert. Nach 8 h wurden pro Well einer sterilen 96-Well Lumineszenzmessplatte  $10^5$  Zellen überführt und für 16 h inkubiert. Darauf erfolgte eine einstündige Vorinkubation in DMEM unter Inkubation bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> sowie die 24-stündige Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen von GC-1

(Abb. 27A, B), NH-3 (Abb. 27C, D) oder GC-24 (Abb. 27E, F) in DMEM ohne weitere Zusätze. Die Ansätze mit NH-3 wurden zusätzlich mit 1 nM T<sub>3</sub> koinkubiert. Dann wurden Luziferase-Assays durchgeführt.

GC-1 Dosis-Wirkungskurven hatten Maximalinduktionen von ca. 20-fach relativ zur Lösungsmittelkontrolle (Abb. 27A) und zeigten EC<sub>50</sub>-Werte von 0,7 nM (Abb. 27B). Bereits 10<sup>-10</sup> M GC-1 induzierten die Reporterogenaktivität signifikant (ANOVA, Dunnett-Test).



**Abb. 27: Effekte von GC-1, GC-24 und NH-3 in hTRβ1-kotransfizierten HepG2**

In eine T75 Zellkulturflasche wurden 1,2 · 10<sup>7</sup> HepG2 Zellen ausgesät und über Nacht kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 22,5 µg p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*<sup>+</sup> und 7,5 µg pRS-hTRβ<sub>1</sub> kotransfiziert. Nach 8 h wurden je 10<sup>5</sup> der transfizierten Zellen pro Well in eine 96-Well Platte überführt und für 16 h im Inkubator inkubiert. Die Zellen wurden darauf hin für 1 h in DMEM ohne Zusätze im Inkubator vorinkubiert, dann folgte ein Mediumwechsel gegen frisches DMEM und die Inkubation mit steigenden Konzentrationen von GC-1 (A, B), NH-3 (C, D) oder GC-24 (E, F) sowie den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen. Alle Ansätze mit NH-3 wurden koinkubiert mit 1 nM T<sub>3</sub>. Nach 24 h wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt. Die Strukturformel von GC-24 ist in (E) abgebildet. Die sigmoidalen Dosis-Wirkungskurven und die EC<sub>50</sub>- bzw. IC<sub>50</sub>-Werte wurden mit der Funktion „sigmoidal dose-response“ der Software GraphPad Prism 4 berechnet. Die statistische Analyse erfolgte durch ANOVA und Dunnett-Test.

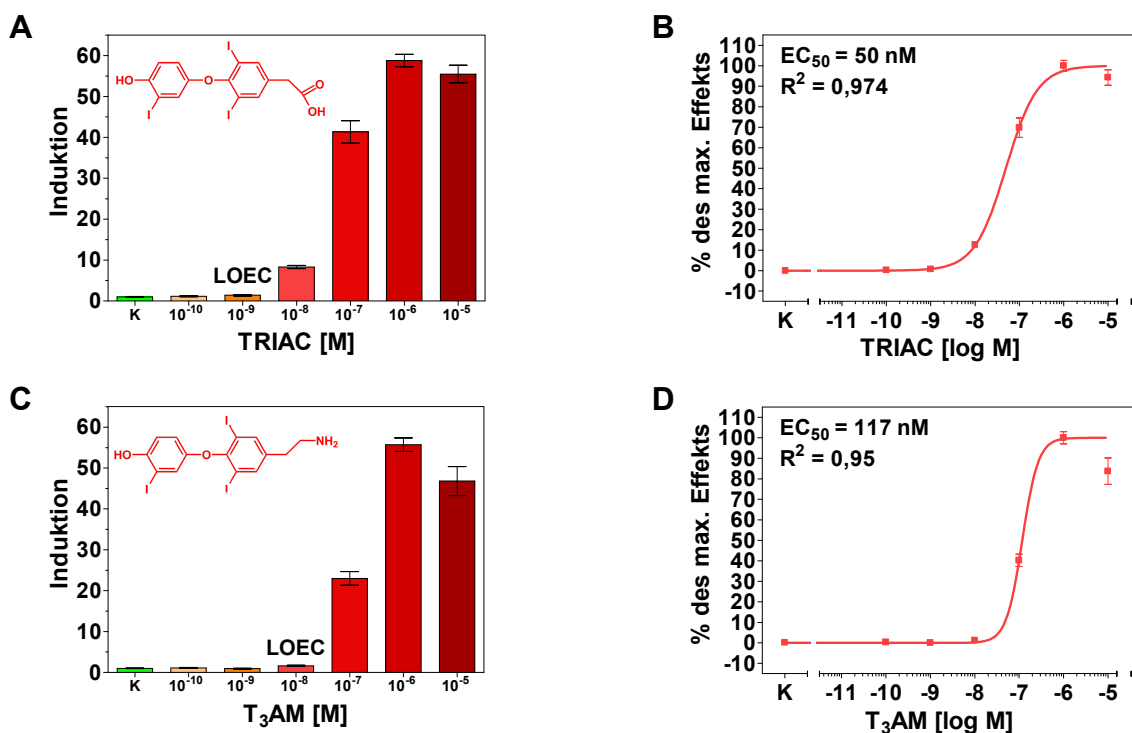
Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$  NH-3 reduzierten die Luziferase-Aktivität relativ zur Lösungsmittelkontrolle auf ca. 20 % (Abb. 27C) und die Dosis-Wirkungskurve hatte einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 87 nM (D). GC-24 war nicht ganz so potent wie GC-1 und erzielte Maximalinduktionen von ca. 15-fach (Abb. 27E). Der  $\text{EC}_{50}$ -Wert von GC-24 lag bei 19 nM und die LOEC bei 1 nM (Abb. 27F).

### 3.2.15 Untersuchung von Schilddrüsenhormonmetaboliten

Verschiedene Metaboliten von Schilddrüsenhormonen können *in vivo* nachgewiesen werden und nur wenig ist über eine mögliche physiologische Funktion dieser Thyroninderivate bekannt. Einige Metaboliten wurden hier auf ihre Fähigkeit, die TR-vermittelte Genexpression zu beeinflussen, untersucht. Dazu wurden  $2,4 \cdot 10^7$  HepG2 in T150 Zellkulturflaschen ausgesät und nach 24 h mit 45  $\mu\text{g}$  p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ und 15  $\mu\text{g}$  pRS-rTR $\alpha_1$  unter Verwendung von 300  $\mu\text{L}$  PolyFect transfiziert. Einer Ruhephase von 8 h folgte der Transfer von je  $10^5$  transfizierten Zellen pro Well in 96-Well Lumineszenzmessplatten. Die Zellen wurden für 16 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung inkubiert und dann für 1 h in DMEM im Inkubator vorinkubiert. Darauf wurde ein Mediumwechsel zu frischem DMEM ohne Zusätze durchgeführt und die Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen Konzentrationen der Thyroninderivate Thyronin (T<sub>0</sub>), 3-Iod-L-thyronin (3-T<sub>1</sub>), 3'-Iod-L-thyronin (3'-T<sub>1</sub>), 3,3'-Diiod-L-thyronin (3,3'-T<sub>2</sub>), 3,5-Diiod-L-thyronin (3,5-T<sub>2</sub>), 3',5'-Diiod-L-thyronin (3',5'-T<sub>2</sub>), 3,3',5'-Triiod-L-thyronin (rT<sub>3</sub>), 3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin (T<sub>4</sub>), 3,3',5-Triiod-thyroessigsäure (TRIAC) und 3,3',5-Triiodthyronamin (T<sub>3</sub>AM) inkubiert. Alle Ansätze wurden in Quadruplikaten durchgeführt. Dann wurden die Zellen lysiert und Luziferase-Assays wurden durchgeführt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte durch ANOVA und Dunnett-Test. Für TRIAC und T<sub>3</sub>AM konnten  $\text{EC}_{50}$ -Werte berechnet werden, da in der höchsten eingesetzten Konzentration bereits das Plateau der jeweiligen Dosis-Wirkungskurve erreicht wurde.

TRIAC ist als TR-Agonist bekannt (Wu et al. 2005; Flamant et al. 2006). In diesem T<sub>3</sub>-Reporter-genassay hatte TRIAC eine Dosis-Wirkungskurve mit Maximalinduktionen von ca. 59-fach bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  und wies einen  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 50 nM auf (Abb. 28A, B). Die niedrigste effektive Konzentration (LOEC) mit einer statistisch signifikanten Wirkung lag bei 1 nM. Im T<sub>3</sub>-Kompetitionsassay wurden Maximalinduktionen von 2,7-fach erreicht und die LOEC lag bei 100 nM (nicht abgebildet). Mit T<sub>3</sub>AM wurden in diesen Konzentrationen ähnlich hohe Induktionen von 58-fach gemessen (Abb. 28C). Dabei hatte T<sub>3</sub>AM einen  $\text{EC}_{50}$ -Wert von 117 nM und eine LOEC von 10 nM (Abb. 28C, D). Im Kompetitionsassay wurde eine LOEC von

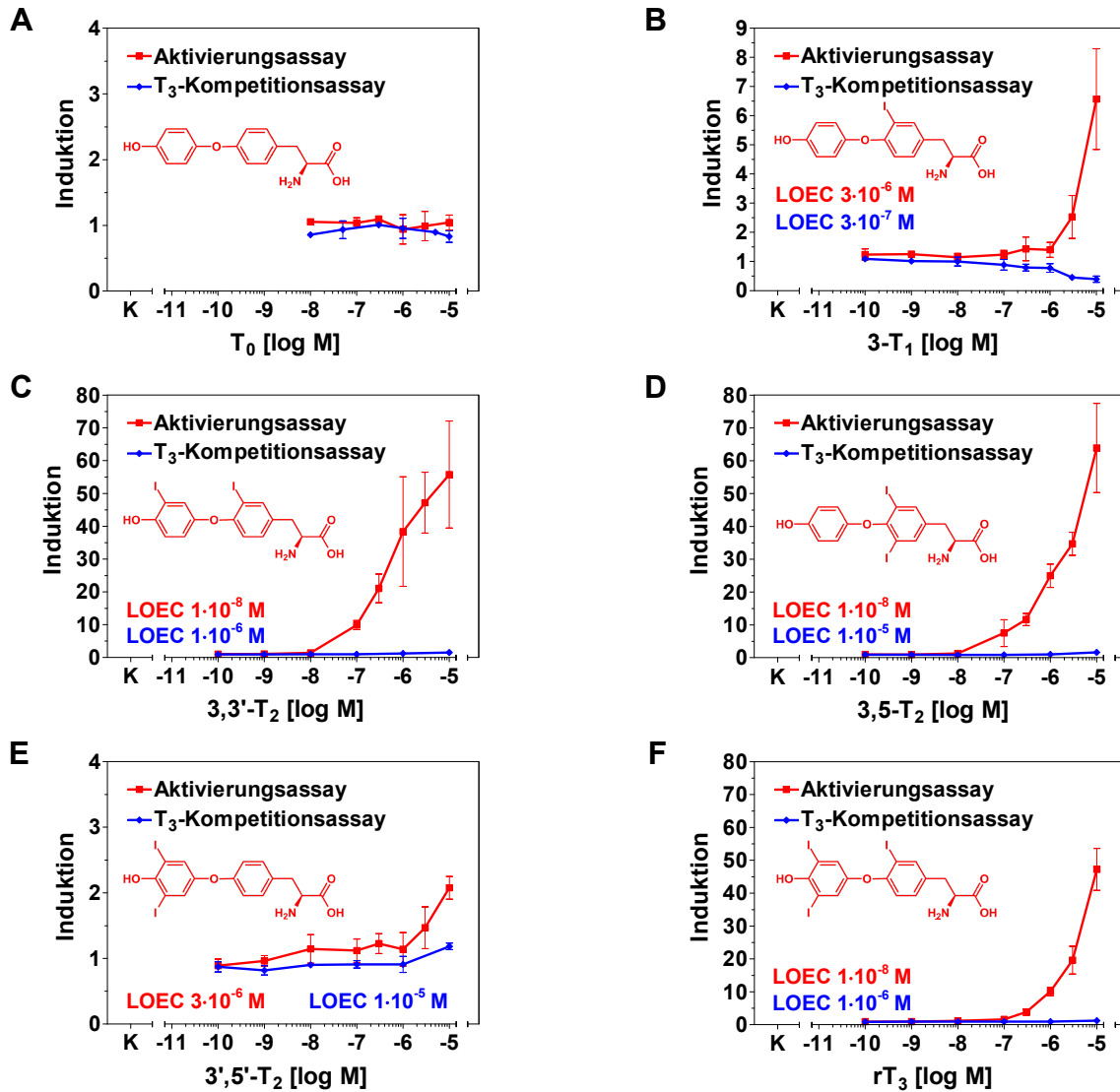
1  $\mu\text{M}$  bestimmt und es wurde eine Maximalinduktion von 2,1-fach erreicht (nicht abgebildet).



**Abb. 28: Dosis-Wirkungskurve von TRIAC und  $T_3\text{AM}$**

HepG2 Zellen wurden mithilfe von 300  $\mu\text{L}$  PolyFect mit 45  $\mu\text{g}$   $p(\text{DR4})_2\text{-SV40-luc+}$  und 15  $\mu\text{g}$   $\text{pRS-rTR}\alpha_1$  kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit steigenden Konzentrationen der angegebenen Thyroninderivate inkubiert und die Luziferase-Aktivitäten bestimmt. In (A) ist die durch steigende TRIAC-Konzentrationen erzielte Induktion des Reportergens dargestellt und in (C) ist die Reportergeninduktion durch steigende  $T_3\text{AM}$ -Konzentrationen abgebildet. Außerdem ist die Strukturformel von TRIAC in (A) und die von  $T_3\text{AM}$  in (C) dargestellt. In (B) und (D) werden die Dosis-Wirkungskurven sowie der  $EC_{50}$ -Werte von TRIAC bzw.  $T_3\text{AM}$  gezeigt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens 2 unabhängigen Experimenten in Quadruplikaten und die statistische Analyse erfolgte durch ANOVA und nachfolgendem Dunnett-Test.

$T_0$  hatte im Aktivierungsassay keine signifikanten Effekte (Abb. 29A). 3- $T_1$  war ein gemischter Agonist/Antagonist von  $\text{rTR}\alpha_1$  ab Konzentrationen von 100 nM (Abb. 29B). 3,3'- $T_2$  und 3,5'- $T_2$  wirkten als potente Agonisten und erzielten Induktionen von ca. 55-fach (Abb. 29C, D). Hingegen war 3',5'- $T_2$  ein schwacher Agonist mit Maximalinduktionen von 2-fach (Abb. 29E).  $\text{rT}_3$  war auch agonistisch und erzielte Maximalinduktionen von 46-fach über Kontrollwerten (Abb. 29F).



**Abb. 29: Dosis-Wirkungskurve verschiedener Thyroninderivate**

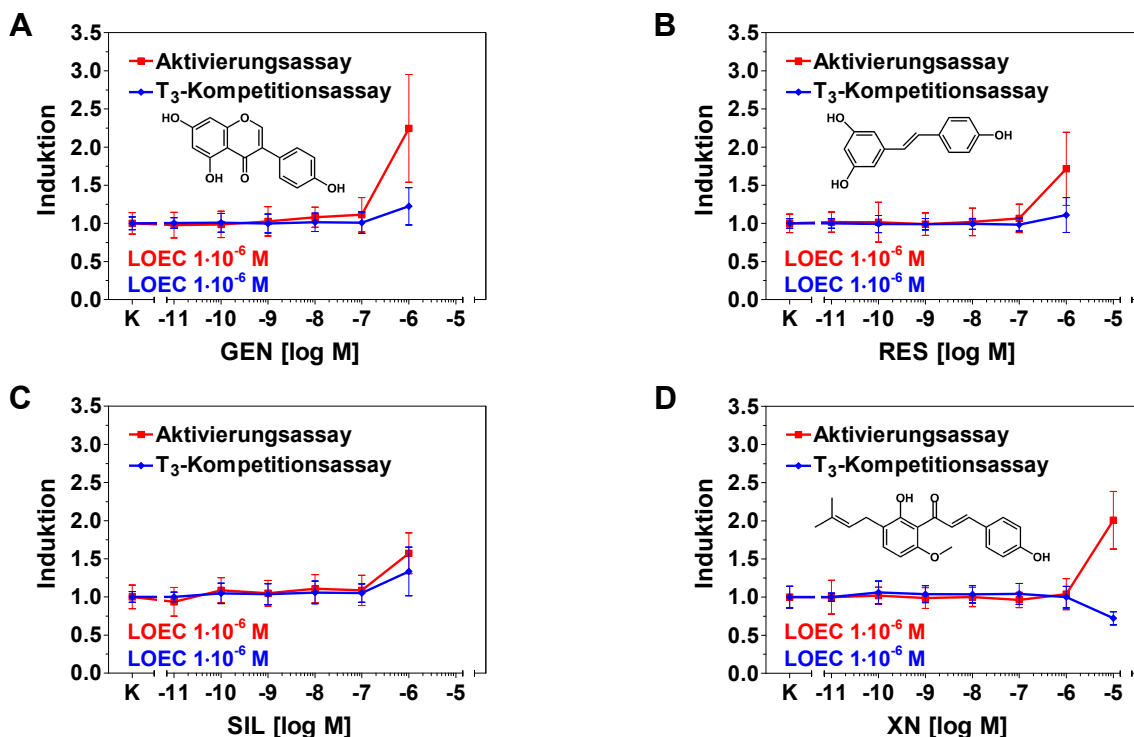
HepG2 Zellen wurden mittels 300 µL PolyFect mit 45 µg p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*<sup>+</sup> und 15 µg pRS-rTRα<sub>1</sub> kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 24 h mit steigenden Konzentrationen unterschiedlicher Thyroninderivate (T<sub>0</sub> in A; 3-T<sub>1</sub> in B; 3,3'-T<sub>2</sub> in C; 3,5-T<sub>2</sub> in D; 3',5'-T<sub>2</sub> in E und rT<sub>3</sub> in F) inkubiert und die Luziferase-Aktivität bestimmt. In „Aktivierungsassays“ (rote Linien) wurden steigende Konzentrationen der Substanzen alleine inkubiert, während in „T<sub>3</sub>-Kompetitionsassays“ (blaue Linien) die Substanzen zusammen mit 1 nM T<sub>3</sub> inkubiert wurden. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SD von mindestens einem Experiment in Quadruplikaten. Zur statistischen Analyse wurden ANOVA und Dunnett-Tests durchgeführt. Die LOEC der Aktivierungsassays sind in roter Schrift angegeben und die von T<sub>3</sub>-Kompetitionsassays in blauer Schrift. Die chemischen Strukturformeln der Substanzen sind in den jeweiligen Graphen ebenfalls dargestellt.

### 3.3 Untersuchung der ED-Testsubstanzen

#### 3.3.1 Screening von Nahrungsmittelbestandteilen

Zahlreiche Stoffe, die in Nahrungsmitteln vorkommen, wurden in diesem Screening auf  $T_3$ -disruptierende Effekte im Reporter-genassay untersucht. Hierzu wurden zunächst  $2,4 \cdot 10^7$  HepG2 Zellen in T150 Zellkulturflaschen gegeben. Diese wurden nach 24 h unter Verwendung von 300  $\mu$ L PolyFect mit 45  $\mu$ g  $p(\text{DR4})_2\text{-SV40-luc+}$  sowie 15  $\mu$ g  $p\text{RS-rTR}\alpha_1$  transfiziert und für 8 h ruhen gelassen. Dann wurden je  $1 \cdot 10^5$  Zellen pro Well in 96-Well Lumineszenzmessplatten transferiert und nach 16 h für eine weitere Stunde in purem, nicht-supplementiertem DMEM vorinkubiert. Dadurch sollte eine Minimierung der residualen Hormonkonzentration und somit eine Verringerung der Hintergrundaktivität im Assay sowie eine Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Assays erreicht werden. Dann erfolgte die Applikation von unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen (GEN, RES, SIL, XN) für 24 h in frischem DMEM. Bei SIL handelt es sich um eine standardisierte Mixtur aus den Flavonolignanen (Silybin A und B, Isosilybin A und B, Silychristin, Isosilychristin und Silydianin) und dem Isoflavonoid Taxifolin, von denen 7 Substanzen dieselbe Molare Masse besitzen (Kroll et al. 2007; Lee et al. 2007). Zur besseren Vergleichbarkeit wurde eine mittlere Molare Masse verwendet und alle Konzentrationsangaben in Form von Molaritäten gemacht. Die Testsubstanzen wurden entweder alleine für Tests auf  $T_3$ -Agonismus (Aktivierungsassay) oder in Kombination mit 1 nM  $T_3$  für Tests auf  $T_3$ -Antagonismus ( $T_3$ -Kompetitionsassay) appliziert. Es wurden mindestens 3 unabhängige Experimente in Quadruplikaten durchgeführt. Der statistische Vergleich mit der Lösungsmittelkontrolle erfolgte durch ANOVA und Dunnett-Test. Sowohl im Aktivierungsassay als auch im  $T_3$ -Kompetitionsassay wirkte GEN ab 1  $\mu$ M induzierend (Abb. 30A). RES hatte antagonistische Effekte, in beiden Assays mit einer LOEC von 1  $\mu$ M (Abb. 30B). SIL war im Aktivierungs- und im Kompetitionsassay in einer Konzentration von 1  $\mu$ M induzierend bezüglich der  $T_3$ -Reporter-genaktivität und führte zu Induktionsfaktoren von 1,6-fach bzw. 1,3-fach (Abb. 30C). XN zeigte sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M (Abb. 30D). Durch den antagonistischen Effekt im Kompetitionsassay wurde die Reporter-genaktivität um 30 % reduziert. Weitere Substanzen dieser Gruppe wurden in je einem Experiment mit vier Replikaten untersucht. Die Ergebnisse dazu sind in Tabelle 11 dargestellt.

## ERGEBNISSE



**Abb. 30: Screening von Nahrungsmittelbestandteilen**

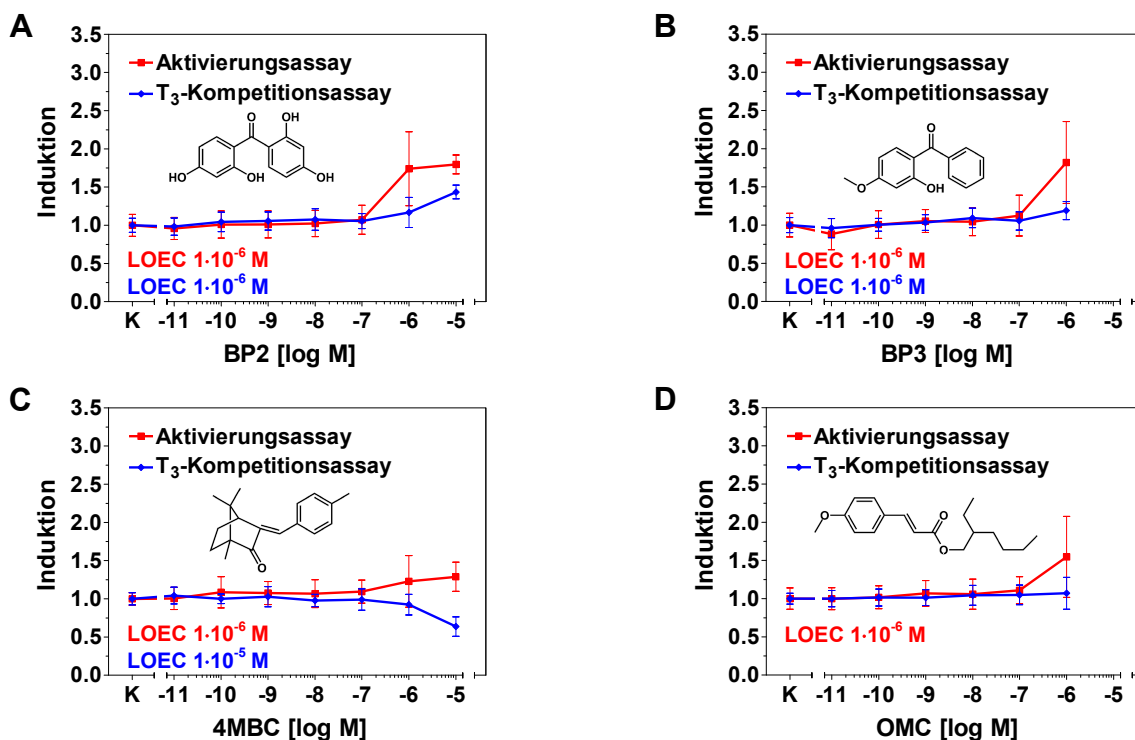
In eine T150 Zellkulturflasche wurden  $2,4 \cdot 10^7$  HepG2 Zellen ausgesät und über Nacht kultiviert. Dann wurden die Zellen mit  $45 \mu\text{g p(DR4)}_2\text{-SV40-}luc+$  und  $15 \mu\text{g pRS-rTR}\alpha_1$  kotransfiziert. Nach 8 h wurden je  $1 \cdot 10^5$  der transfizierten Zellen pro Well in eine 96-Well Platte überführt und für 16 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden dann für 1 h in DMEM ohne Zusätze im Inkubator vorinkubiert, dann folgte ein Mediumwechsel gegen frisches DMEM und die Inkubation mit steigenden Konzentrationen von GEN (A), RES (B), SIL (C) oder XN (D) sowie den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (0,05 % DMSO in DMEM). „Aktivierungsassay“ (rote Linie) bezeichnet Experimente mit Applikation der puren Substanz, während „T<sub>3</sub>-Kompetitionsassay“ (blaue Linie) Experimente mit Koinkubationen steigender Konzentrationen von Testsubstanzen mit 1 nM T<sub>3</sub> als Kompetitor bezeichnet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in Quadruplikaten und zur statistischen Analyse wurden ANOVA und nachfolgende Dunnett-Tests durchgeführt. LOEC bezeichnet die niedrigste Konzentration, in der eine Substanz eine statistisch signifikante Veränderung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle bewirkte. Die chemischen Strukturformeln der Substanzen sind in den jeweiligen Graphen ebenfalls dargestellt, nur von SIL ist keine Struktur angegeben, da es sich um eine standardisierte Mixtur mehrerer Substanzen handelt.

**Tab. 11: Weitere Nahrungsmittelbestandteile und ihre Induktionsfaktoren**

Substanz	Aktivierungsassay	T <sub>3</sub> -Kompetitionsassay
Apigenin	$\geq 10 \mu\text{M}$ 2,6x ↑	$\geq 10 \mu\text{M}$ 1,8x ↑
Hispidulin	$\geq 10 \mu\text{M}$ 1,6x ↑	$\geq 10 \mu\text{M}$ 1,3x ↑
Myristicin	$\geq 10 \mu\text{M}$ 1,5x ↑	-
Naringenin	$\geq 1 \mu\text{M}$ 1,4x ↑	-

### 3.3.2 Screening von UV-Filtern aus Kosmetika

Für das Screening von potenziellen Disruptoren der  $T_3$ -vermittelten Genexpression durch UV-Filter aus Kosmetika des täglichen Gebrauchs wurden  $2,4 \cdot 10^7$  HepG2 Zellen in T150 Zellkulturflaschen überführt und nach 24 h mittels 300  $\mu$ L PolyFect mit 45  $\mu$ g p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ sowie 15  $\mu$ g pRS-rTR $\alpha_1$  transfiziert. Nach 8 h wurden je  $10^5$  transfizierte Zellen pro Well in bis zu sechs 96-Well Lumineszenzmessplatten transferiert. Nach 16 h wurden die Zellen für 1 h in phenolrotfreiem DMEM ohne Zusätze unter Inkubation im Zellkulturbrutschrank vorinkubiert. Dann wurden die Zellen für 24 h in frischem DMEM mit verschiedenen Konzentrationen von BP2, BP3, 4MBC oder OMC inkubiert. Um die Substanzen auf  $T_3$ -agonistische Effekte zu testen, wurden die Zellen mit den reinen Substanzen inkubiert (Aktivierungsassay).



**Abb. 31: Screening von UV-Filtern aus Kosmetika**

In eine T150 Zellkulturflasche wurden  $2,4 \cdot 10^7$  HepG2 Zellen ausgesät und über Nacht kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 45  $\mu$ g p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ und 15  $\mu$ g pRS-rTR $\alpha_1$  kotransfiziert. Nach 8 h wurden je  $1 \cdot 10^5$  der transfizierten Zellen pro Well in eine 96-Well Platte überführt und für 16 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden danach für 1 h in DMEM ohne Zusätze im Inkubator vorinkubiert, dann folgte ein Mediumwechsel gegen frisches DMEM und die Inkubation mit steigenden Konzentrationen von BP2 (A), BP3 (B), 4MBC (C) oder OMC (D) sowie den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (0,05 % DMSO in DMEM). „Aktivierungsassay“ (rote Linie) bezeichnet Experimente mit Applikation der reinen Substanz, während „ $T_3$ -Kompetitionsassay“ (blaue Linie) Experimente mit Koinkubationen steigender Konzentrationen von Testsubstanzen mit 1 nM  $T_3$  als Kompetitor bezeichnet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in Quadruplikaten und zum statistischen Vergleich mit der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle wurden ANOVA und Dunnett-Tests durchgeführt. In Rot sind die LOEC für Aktivierungsassays und in Blau für  $T_3$ -Kompetitionsassays angegeben. Die chemischen Strukturformeln der Substanzen sind in den jeweiligen Graphen ebenfalls dargestellt.



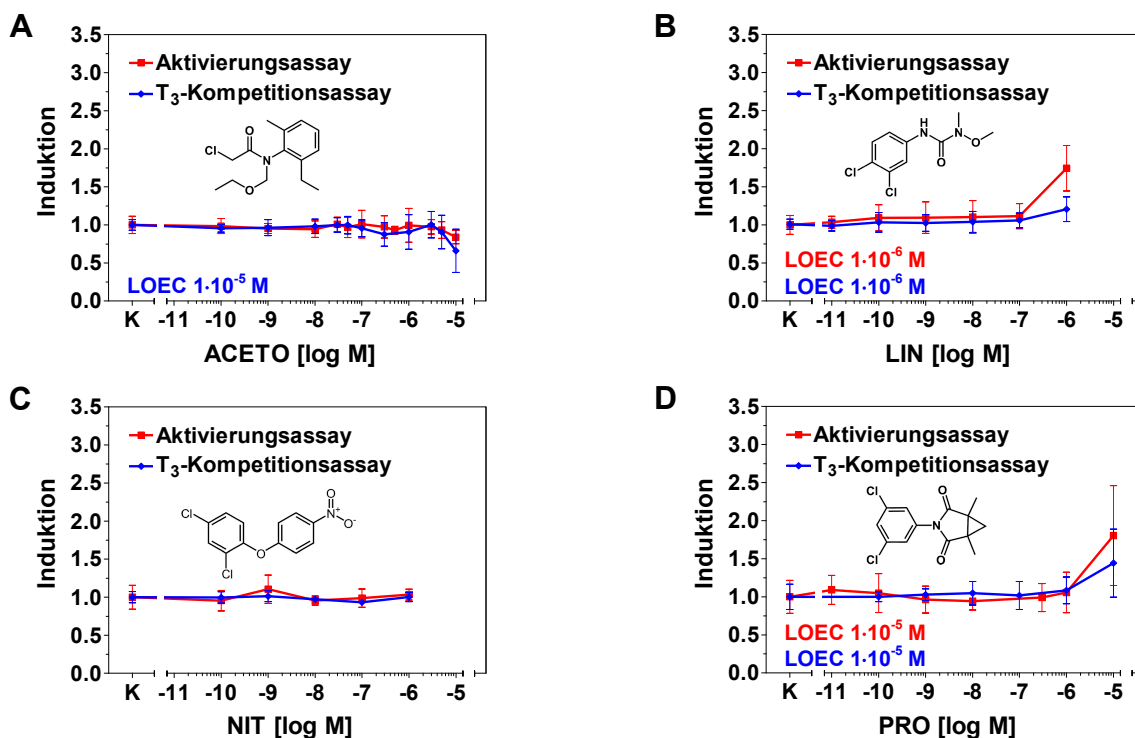
Für Tests auf  $T_3$ -Antagonismus ( $T_3$ -Kompetitionsassay) wurden die steigenden Konzentrationen der Substanzen mit 1 nM  $T_3$  als Kompetitor koinkubiert. Es wurden mindestens 3 unabhängige Experimente in Quadruplikaten durchgeführt. Die BP2-Behandlung wies eine LOEC von 1  $\mu$ M auf und führte in einer Konzentration von 10  $\mu$ M zu einer statistisch signifikanten Induktion des  $T_3$ -Reportergens um das 1,8-fache des basalen Wertes (Abb. 31A). Auch in Konkurrenz mit 1 nM  $T_3$  wurden mit einer LOEC von 1  $\mu$ M BP2 leichte Induktionen von 1,4-fach gemessen. BP3 induzierte die Luziferase-Aktivität im Aktivierungsassay in einer Konzentration von 1  $\mu$ M um 1,8-fach und im Kompetitionsassay um 1,2-fach (Abb. 31B). 4MBC führte bei Einzelapplikation ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M zu Induktionen, die bei 10  $\mu$ M den 1,3-fachen Wert der Kontrollgruppe erreichten (Abb. 31C). Bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M hatte 4MBC antagonistische Effekte im Kompetitionsassay und reduzierte die Luziferase-Aktivität auf 50 % des Kontrollwertes. OMC zeigte keine Konkurrenz mit  $T_3$ , jedoch statistisch signifikante Induktionen im Aktivierungsassay mit einer LOEC von 1  $\mu$ M (Abb. 31D).

### 3.3.3 Screening von Pestiziden

Im kommerziellen Obst- und Gemüseanbau sowie beim Transport der Agrarprodukte zum Endkunden werden unterschiedliche Fungizide, Pestizide und Herbizide eingesetzt, deren Wirkung auf die  $T_3$ -vermittelte Genexpression hier exemplarisch untersucht wurde. Zu diesem Zweck wurden zunächst  $2,4 \cdot 10^7$  HepG2 Zellen in T150 Zellkulturflaschen ausgesät, die nach 24 h unter Zuhilfenahme von 300  $\mu$ L PolyFect mit 45  $\mu$ g p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ und 15  $\mu$ g pRS-rTR $\alpha_1$  transfiziert wurden. Nach 8 h wurden je  $10^5$  Zellen pro Well in sterile 96-Well Lumineszenzmessplatten transferiert und 16 h später unter Inkubation im Brutschrank für 1 h in DMEM ohne Zusätze vorinkubiert. Dann erfolgte eine 24-stündige Inkubation in An- oder Abwesenheit von steigenden Konzentrationen verschiedener Testsubstanzen (ACETO, LIN, NIT oder PRO) in frischem DMEM. Für  $T_3$ -Kompetitionsassays wurden die Testsubstanzen mit 1 nM  $T_3$  als Kompetitor koinkubiert und mit der Lösungsmittelkontrolle (0,05 % DMSO) plus 1 nM  $T_3$  verglichen, während für Aktivierungsassays die Substanzen allein appliziert wurden. Die Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt und jeweils in Quadruplikaten durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und Dunnett-Test.

ACETO reduzierte die Luziferase-Werte im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle bei einer Konzentration von 10  $\mu$ M (LOEC) auf das 0,7-fache im  $T_3$ -Kompetitionstest und hatte keinen Effekt im Aktivierungsassay (Abb. 32A). LIN

wirkte im Aktivierungs- und im Kompetitionsassay jeweils mit einer LOEC von 1  $\mu$ M induzierend auf die T<sub>3</sub>-Reportergenaktivität und erzielte dabei Induktionen von 1,7-fach im Test auf Aktivierung und 1,2-fach im Kompetitionsassay (Abb. 32B). NIT hatte keine statistisch signifikanten Effekte (Abb. 32C). PRO induzierte in beiden Assays die gemessene Luziferase-Aktivität bei einer LOEC von 10  $\mu$ M 1,8-fach im Aktivierungs- und 1,4-fach im Kompetitionsassay (Abb. 32D).



**Abb. 32: Screening von Pestiziden**

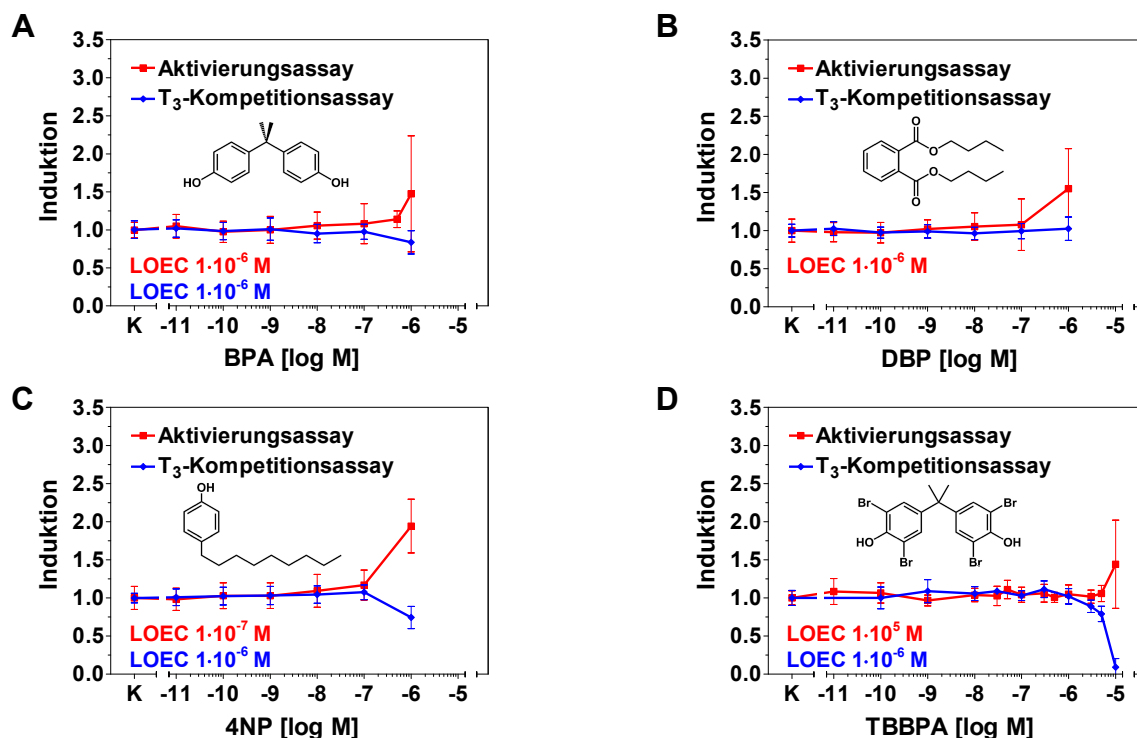
In eine T150 Zellkulturflasche wurden  $2,4 \cdot 10^7$  HepG2 Zellen ausgesät und über Nacht kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 45  $\mu$ g p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*<sup>+</sup> und 15  $\mu$ g pRS-rTR $\alpha_1$  kotransfiziert. Nach 8 h wurden je  $1 \cdot 10^5$  der transfizierten Zellen pro Well in eine 96-Well Platte überführt und für 16 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden darauf hin für 1 h in DMEM ohne Zusätze im Inkubator vorinkubiert, dann folgte ein Mediumwechsel gegen frisches DMEM und die Inkubation mit steigenden Konzentrationen von ACETO (A), LIN (B), NIT (C) oder PRO (D) sowie den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (0,05 % DMSO in DMEM). „Aktivierungsassay“ (rote Linie) bezeichnet Experimente mit Applikation der puren Substanz, während „T<sub>3</sub>-Kompetitionsassay“ (blaue Linie) Experimente mit Koinkubationen steigender Konzentrationen von Testsubstanzen mit 1 nM T<sub>3</sub> als Kompetitor bezeichnet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in Quadruplikaten und die statistische Auswertung der Daten wurden mittels ANOVA und nachfolgendem Dunnett-Test durchgeführt. In Rot sind die LOEC der Aktivierungs- und in Blau die der Kompetitionsassays angegeben. Die chemischen Strukturformeln der Substanzen sind in den jeweiligen Graphen ebenfalls dargestellt.

### 3.3.4 Screening von Industriechemikalien

Unterschiedliche Industriechemikalien, die z. B. durch Verwendung in der Kunststoffversiegelung von Nahrungsmittelkonserven (BPA) oder als Flammschutzmittel in Elektronikprodukten (TBBPA) zu Humanexposition führen,

## ERGEBNISSE

wurden in diesem Assay untersucht. Dafür wurden  $2,4 \cdot 10^7$  HepG2 Zellen in T150 Zellkulturflaschen ausgesät und nach 24 h mittels 300  $\mu\text{L}$  PolyFect mit 45  $\mu\text{g}$  p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ sowie 15  $\mu\text{g}$  pRS-rTR $\alpha_1$  transfiziert. Acht Stunden später wurden je  $10^5$  Zellen pro Well in 96-Well Lumineszenzmessplatten überführt. Nach 16 h wurden die Zellen für 1 h in DMEM vorinkubiert und daraufhin für 24 h in frischem DMEM mit steigenden Konzentrationen von BPA, DBP, 4NP oder TBBPA inkubiert. Die Substanzen wurden entweder alleine für Tests auf T<sub>3</sub>-Agonismus oder in Kombination mit 1 nM T<sub>3</sub> für T<sub>3</sub>-Kompetitionsassays appliziert. Es wurden mindestens 3 unabhängige Experimente in Quadruplikaten durchgeführt. Als statistische Tests wurden ANOVA mit nachgeschaltetem Dunnett-Test durchgeführt.



**Abb. 33: Screening von Industriechemikalien**

In eine T150 Zellkulturflasche wurden  $2,4 \cdot 10^7$  HepG2 Zellen ausgesät und über Nacht kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 45  $\mu\text{g}$  p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ und 15  $\mu\text{g}$  pRS-rTR $\alpha_1$  kotransfiziert. Nach 8 h wurden je  $1 \cdot 10^5$  der transfizierten Zellen pro Well in eine 96-Well Platte überführt und für 16 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden dann für 1 h in DMEM ohne Zusätze vorinkubiert, dann folgte ein Mediumwechsel gegen frisches DMEM und die Inkubation mit steigenden Konzentrationen von BPA (A), DBP (B), 4NP (C) oder TBBPA (D) sowie den entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (0,05 % DMSO in DMEM). „Aktivierungsassay“ (rote Linie) bezeichnet Experimente mit Applikation der puren Substanz, während „T<sub>3</sub>-Kompetitionsassay“ (blaue Linie) Experimente mit Koinkubationen steigender Konzentrationen der Testsubstanzen mit 1 nM T<sub>3</sub> als Kompetitor bezeichnet. Die chemischen Strukturformeln der Substanzen sind in den jeweiligen Graphen ebenfalls dargestellt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SD von mindestens 3 unabhängigen Experimenten in Quadruplikaten und zur statistischen Analyse der Daten wurden ANOVA mit nachfolgenden Dunnett-Tests durchgeführt. Die LOEC-Werte von Aktivierungsassays sind rot dargestellt und für T<sub>3</sub>-Kompetitionsassays sind sie in Blau angegeben.

BPA führte bei Inkubation ohne  $T_3$  mit einer LOEC von 1  $\mu\text{M}$  zu signifikanten Induktionen des  $T_3$ -Reportergens um 1,6-fach und hatte bei gleicher Konzentration auch signifikante Verminderung der Luziferase-Aktivität auf 80 % der Kontrollwerte im  $T_3$ -Kompetitionsassay zur Folge (Abb. 33A).

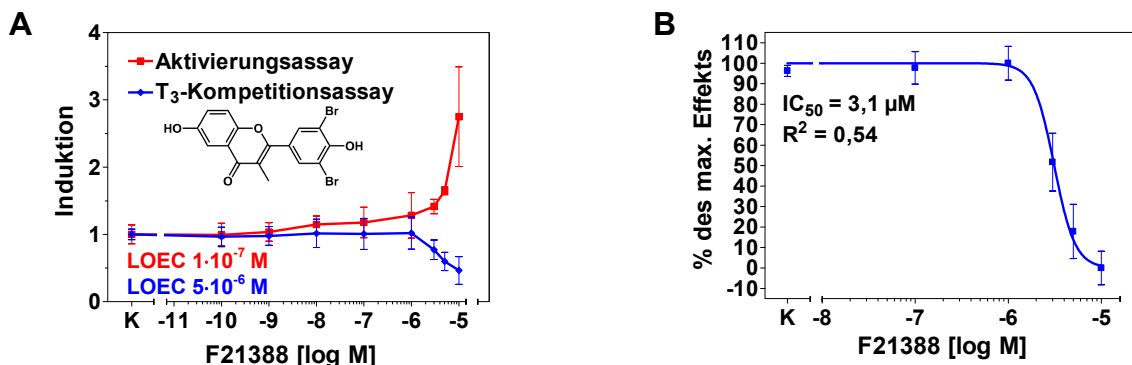
DBP induzierte im Aktivierungsassay mit einer LOEC von 1  $\mu\text{M}$  die Reportergenaktivität, hatte aber keine Wirkung im Kompetitionsassay (Abb. 33B).

4NP hatte in Konzentrationen ab 100 nM induzierende Effekte im Aktivierungsassay (1,9x bei 1  $\mu\text{M}$ ) und reduzierte die Luziferase-Expression um 30 % im Kompetitions-Screening bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  (Abb. 33C). TBBPA wies  $T_3$ -agonistischen Eigenschaften bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  auf, war jedoch auch ein potenter  $T_3$ -Antagonist im Kompetitionsassay mit einer LOEC von 1  $\mu\text{M}$  und reduzierte die Luziferase-Aktivität bei 10  $\mu\text{M}$  auf 10 % der Werte in der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 33D).

### 3.3.5 Untersuchung der Wirkung von F21388 auf den $T_3$ -Reportergenassay

Das synthetische Flavonoid F21388 hat strukturelle Ähnlichkeit mit Thyroxin und übt Effekte auf das Schilddrüsenhormonsystem aus (Hamann et al. 2006; Schmutzler et al. 2007). Zur Untersuchung der Wirkung von F21388 auf die  $T_3$ -regulierte Genexpression wurden  $3,9 \cdot 10^6$  HepG2 Zellen in eine T25 Zellkulturflasche ausgesät und nach 24 h unter Verwendung von 50  $\mu\text{L}$  PolyFect mit 7,5  $\mu\text{g}$  p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ sowie 2,5  $\mu\text{g}$  pRS-rTR $\alpha_1$  transfiziert. Nach 8 h wurden die Zellen auf 96-Well Messplatten überführt ( $1 \cdot 10^5$  Zellen/Well). Weitere 16 h später wurden die Zellen für eine Stunde im Inkubator mit DMEM vorinkubiert und dann für 24 h mit unterschiedlichen F2188-Konzentrationen inkubiert.

Für  $T_3$ -Kompetitionsexperimente wurden F21388 mit 1 nM  $T_3$  koinkubiert. Es wurden mindestens 6 unabhängige Experimente mit je 4 Replikaten durchgeführt. Zur statistischen Analyse wurden ANOVA mit nachfolgenden Dunnett-Tests durchgeführt. In Konzentrationen ab 100 nM induzierte F21388 die Reportergenaktivität dosisabhängig um bis zu 2,8-fach bei 10  $\mu\text{M}$  (Abb. 34A). Im Kompetitionsassay reduzierte F21388 die Reportergenaktivität ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  statistisch signifikant. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  wurde die Luziferase-Expression um 50 % relativ zur Lösungsmittelkontrolle reduziert. Die berechnete Dosis-Wirkungskurve für die kompetitive Situation lieferte einen  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 3,1  $\mu\text{M}$  (Abb. 34B).

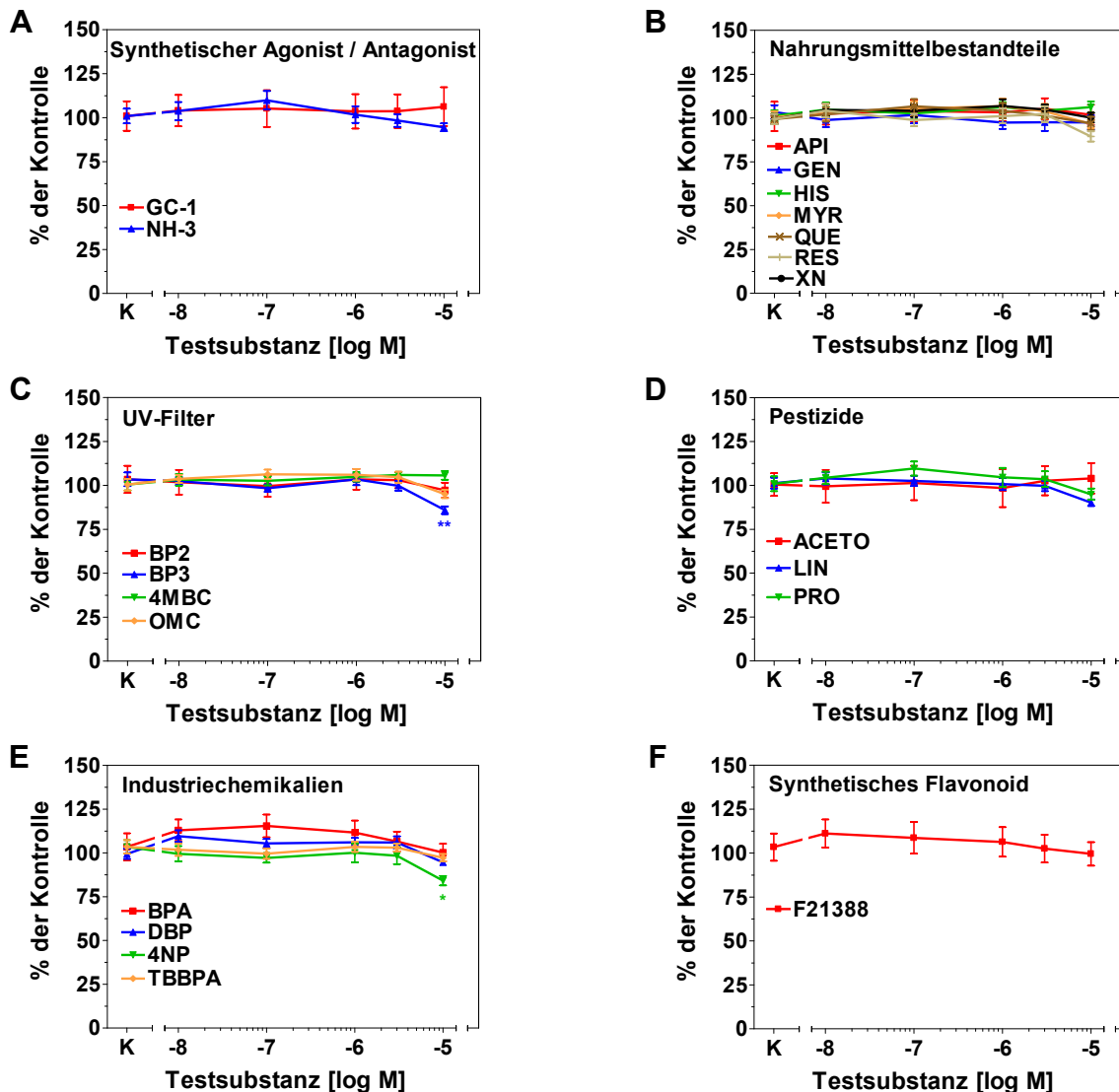


**Abb. 34: Effekte von F21388 im T<sub>3</sub>-Reportergenassay**

In T25 Zellkulturflaschen wurden  $3,9 \cdot 10^6$  HepG2 Zellen ausgesät und über Nacht kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 7,5 μg p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ und 2,5 μg pRS-rTRα<sub>1</sub> kotransfiziert. Nach 8 h wurden je  $1 \cdot 10^5$  der transfizierten Zellen pro Well in eine 96-Well Platte überführt und für 16 h im Brutschrank vorinkubiert. Die Zellen wurden darauf für 1 h in DMEM ohne Zusätze im Inkubator vorinkubiert, dann folgte ein Mediumwechsel gegen frisches DMEM und die Inkubation in An- oder Abwesenheit verschiedenen Konzentrationen von F21388. „Aktivierungsassay“ (rote Linie) bezeichnet Experimente mit Einzelapplikation von F21388, während „T<sub>3</sub>-Kompetitionsassay“ (blaue Linie) Experimente mit Koinkubationen steigender Konzentrationen von F21388 mit 1 nM T<sub>3</sub> als Kompetitor bezeichnet. In (A) ist die chemische Struktur von F21388 abgebildet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte ± SD von mindestens sechs unabhängigen Experimenten in Quadruplikaten. Die statistische Datenanalyse erfolgte mittels ANOVA und Dunnett-Test. In Rot ist die LOEC von F21388 im Aktivierungsassay und in Blau im T<sub>3</sub>-Kompetitionsassay angegeben.

### 3.3.6 Effekte der Testsubstanzen auf die Zellvitalität

Zur Überprüfung, ob die Testsubstanzen innerhalb der für die Reportergenassays typischen Konzentrationen und Inkubationsdauer von 24 h einen Einfluss auf die Vitalität der HepG2 Zellen haben, wurden Vitalitätsassays durchgeführt. Dafür wurden pro Well einer 96-Well Lumineszenzmessplatte  $10^4$  HepG2-Zellen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen jeweils in Quadruplikaten für 24 h mit steigenden Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Dann erfolgten Vitalitätsassays (CellTiter-Glo, Promega) und zur statistischen Analyse wurden ANOVA und Dunnett-Tests durchgeführt. Die meisten der getesteten Substanzen hatten bei 24-stündiger Inkubation keine statistisch signifikanten Effekte auf die Vitalität der HepG2 Zellen (Abb. 35). Nur BP3 (Abb. 35C) und 4NP (Abb. 35E) führten zu einer schwachen und statistisch signifikanten Reduktion des ATP-Gehaltes im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. RES hatte einen schwachen, statistisch nicht-signifikanten inhibitorischen Effekt bei einer Konzentration von 10 μM (Abb. 35B).



**Abb. 35: Einfluss der Testsubstanzen auf die Zellvitalität**

Für Vitalitätsassays wurden  $1 \cdot 10^4$  HepG2 Zellen pro Well in 96-Well Platten ausgesät und am folgenden Tag für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Dann wurde der relative ATP-Gehalt der Zellen mit einem Lumineszenzassay (CellTiter-Glo) bestimmt. Auf der Abszisse ist der relative ATP-Gehalt in Bezug auf die Mittelwerte der jeweiligen Lösungsmittelkontrollen in prozentualer Form dargestellt. In (A) werden die Effekte des synthetischen  $T_3$ -Agonisten GC-1 und des synthetischen  $T_3$ -Antagonisten NH-3 dargestellt. (B) zeigt die Beeinflussung der Zellvitalität durch die getesteten Nahrungsmittelbestandteile, (C) die Effekte der UV-Filter, (D) die Effekte der Pestizide, (E) die Effekte der Industriechemikalien und in (F) sind die Effekte von F21388 dargestellt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  SD von 4 Replikaten und die statistische Analyse erfolgte durch ANOVA und Dunnett-Tests.

### 4 Diskussion

Die Schilddrüse und ihre Hormone spielen in Vertebraten eine entscheidende Rolle in zentralen biologischen Prozessen, wie Entwicklung, Wachstum, Stoffwechsel und Homöostase. In den letzten Jahren mehren sich Befürchtungen und Berichte, dass die Schilddrüsenhormonachse durch exogene synthetische oder natürliche Substanzen, so genannte Endokrine Disruptoren (ED), gestört werden kann. Dabei bietet das Schilddrüsenhormonsystem zahlreiche Ziele für ED. Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Interferenz ausgewählter Testsubstanzen mit dem finalen Endpunkt der  $T_3$ -Wirkung, der  $T_3$ -regulierten Genexpression, zu untersuchen. Hierfür wurde ein  $T_3$ -Reporter-genassay, der das Screening von Substanzen in hohem Durchsatz ermöglicht, aufgebaut. Basierend auf verschiedenen Publikationen zur detaillierten Untersuchung der optimalen TRE-Sequenz wurden Oligonukleotide konstruiert und in Luziferase-Reporter-genplasmide eingebaut. Daraufhin wurden verschiedene Zelllinien und der Effekt von Kotransfektionen mit verschiedenen TR-Expressionsplasmiden getestet sowie Transfektions- und Inkubationsparameter optimiert, sodass hoch reproduzierbare Messungen mit einem großen dynamischen Bereich erzielt wurden. Die Sensitivität dieses Assays liegt im subnanomolaren  $T_3$ -Konzentrationsbereich und deckt somit die physiologisch relevante Größenordnung ab.

Die hierbei gewonnen Erfahrungen und Ergebnisse erlaubten neben dem Aufbau eines Screening-Assays für aktivierende,  $T_3$ -mimetische Effekte der Substanzen auch die Etablierung eines Kompetitionsassays, durch den  $T_3$ -antagonistische Effekte bei Koinkubation mit 1 nM  $T_3$  analysiert wurden. Die Wahl dieser  $T_3$ -Konzentration wurde sowohl aufgrund der physiologischen Konzentration des Hormons im humanen Serum als auch anhand der experimentellen Ergebnisse bei Kotransfektionen mit  $TR\alpha_1$  oder  $TR\beta_1$ , die  $EC_{50}$ -Werte von 1,2 bzw. 1,6 nM lieferten, getroffen. Somit wurde im Kompetitionsassay der Messbereich mit der besten analytischen Dynamik für  $T_3$ -abhängige Genexpression genutzt.

Die Analyse der synthetischen Referenzsubstanzen, UV-Filter, Industriechemikalien, Nahrungsmittelbestandteile und Pestizide lieferte reproduzierbare Ergebnisse sowohl hinsichtlich der agonistischen als auch der antagonistischen Eigenschaften. Statistisch signifikante Effekte wurden vorwiegend erst im mikromolaren Bereich beobachtet und belegen damit, dass von diesen Substanzen in Kleinstmengen zumeist kaum eine direkte Beeinflussung der Schilddrüsenhormonachse ausgeht. Angesichts der großen und stetig steigenden Produktions- und Verbrauchsmengen dieser Substanzen, des Akkumulationspotenzials dieser hydrophoben Stoffe in der Nahrungskette und dem Fettgewebe von Mensch und Tier und zusätzlicher indirekter Wirkmechanismen auf die Schilddrüsenhormonachse bedarf es jedoch einer sorgfältigen Analyse der tatsächlich

zu erwartenden Plasma- und Gewebekonzentrationen, der chronischen Langzeiteffekte und der Derivate, die *in vivo* durch Biotransformation der Substanzen entstehen können. Erst dann können sicherere Aussage zur humanrelevanten Toxizität und ED-Aktivität dieser Stoffe getroffen werden.

Aus diesem Grund werden im Folgenden nun die einzelnen Aspekte dieses neuen Assays für die Beurteilung der ED-Aktivität von zu untersuchenden Substanzen diskutiert und mit der geplanten Aufgabe, wie sie im CREDO und EURISKED Verbund gestellt wurde, verglichen.

### **4.1 Assay Aufbau, Charakterisierung und Optimierung**

Zum Aufbau des Assays wurden unterschiedliche T<sub>3</sub>-Reporterplasmide konstruiert. Zunächst stellte sich die Frage, ob lange Fragmente natürlicher Promotoren von T<sub>3</sub>-Zielgenen (s. 4.2.5), wie der DIO1, in dem zu konstruierenden T<sub>3</sub>-Reporterplasmid zur Verwendung kommen sollten oder ob man alternativ nur die kurzen TRE-Sequenzen einbaut. Da natürliche Promotoren zumeist eine Vielzahl genregulatorischer Elemente für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren enthalten, fiel die Entscheidung zugunsten reiner TRE aus. Die Möglichkeit, dass beobachtete Effekte der zu untersuchenden Testsubstanzen auf einen Einfluss anderer Transkriptionsfaktoren und NR zurückzuführen sein könnten, würde die Unterscheidung und Identifizierung von T<sub>3</sub>/TR-vermittelten Wirkungen andernfalls unnötig erschweren. Grundsätzliche Unterschiede in der Regulation durch T<sub>3</sub> gibt es zwischen positiv- und negativ-T<sub>3</sub>-regulierten TRE. Zwischen den positiv-regulierten TRE, wie DR4, PAL und IP6, gibt es Unterschiede in Bezug auf die bevorzugte Komposition der interagierenden aktiven Rezeptoren (TR-TR- bzw. TR-RXR-Kombinationen), die sich auf die Effizienz der Transkriptionsaktivierung auswirken können, jedoch ist der T<sub>3</sub>-Effekt jeweils ein aktivierender (Velasco et al. 2007). Deshalb wurde beschlossen, neben einem optimalen positiv-regulierten TRE auch ein negativ-reguliertes für die Konstruktion unterschiedlicher T<sub>3</sub>-Reporterkonstrukte zu verwenden. In die Auswahl der TRE-Sequenzen flossen Erkenntnisse aus verschiedenen Publikationen ein, die sich mit der detaillierten Analyse und Charakterisierung von optimalen TRE beschäftigen (Katz und König 1993; Katz und König 1994; Chang und Wei 1997; Harbers et al. 1996; Quack et al. 2002). Nach Sequenzierung der konstruierten Plasmide wurden sie funktionell miteinander verglichen, es wurde ein geeignetes Zellsystem für den T<sub>3</sub>-Reporterassay ermittelt und verschiedene Assay-Parameter optimiert. Dies ist im Folgenden beschrieben.



### 4.1.1 Optimierung für das 96-Well-Format

Für den initialen Vergleich der Effekte von unterschiedlichen Transfektionen, z. B. von Reporter-genplasmiden oder Kotransfektionen mit TR-Expressionsplasmiden, eignet sich die Einzeltransfektion im 96-Well-Format sehr gut. Zur Anpassung des  $T_3$ -Reporter-genassays an das 96-Well Format wurden verschiedene Parameter optimiert. Im Folgenden werden die Optimierungen am Beispiel der HepG2 Zellen diskutiert. Die Anzahl der HepG2 Zellen pro Well, mit der sich bei Einzeltransfektionen zur Untersuchung vieler unterschiedlicher Transfektionen im einzelnen Well die besten Ergebnisse erzielen lassen, lag bei  $5 \cdot 10^4$  (Abb. 21). Zur Anpassung an die speziellen Gegebenheiten bei der Transfektion im 96-Well Format wurde extra eine Transfektionsoptimierung durchgeführt (Abb. 15). Um die Vergleichbarkeit bei unterschiedlichen Kotransfektionen zu gewährleisten, wurden die entsprechenden Plasmidkombinationen der unterschiedlichen Transfektionen zusammen mit einem Normalisierungsvektor kotransfiziert. Die DNA-Gesamtmasse wurde für jede Transfektion konstant gehalten und entsprach den Ergebnissen der Transfektionsoptimierung. Mit dieser Art des Assays lassen sich die Effekte unterschiedlicher Kotransfektionen sehr bequem untersuchen. Somit eignet sich diese Variante hervorragend zur Charakterisierung von Kofaktoren (z. B. CoA und CoR) und TR-Varianten.

Für das Screening von Testsubstanzen wurde nicht nach vielen verschiedenen Transfektionen verlangt, sondern nach einer möglichst gleichmäßigen Transfektion in jedem Well. Dafür eigneten sich Pool-Transfektionen in größeren Zellkulturflaschen und das Transferieren derselben Anzahl identisch transfizierten HepG2 Zellen pro Well auf 96-Well Platten am besten. Hierdurch wird eine Normalisierung mittels Normalisierungsvektor überflüssig, denn diese erfolgt hier über die Zellzahl. Durch eine Transfektionsoptimierung für größere Zellkulturgefäße konnten zunächst die optimalen Transfektionsbedingungen ermittelt werden (Abb. 14 und Tab. 10). Die Anzahl an transfizierten HepG2 Zellen, die nach dem Transfer auf 96-Well Platten die höchsten Induktionen durch  $T_3$ -Stimulation erzielte, wurde in einem separaten Experiment bestimmt und betrug  $10^5$  HepG2 pro Well (Abb. 22). Diese Art der Pool-Transfektion vermindert den Arbeitsaufwand sowohl bei der Transfektion als auch bei der Luziferasemessung - es muss nur die FLuc-Aktivität bestimmt werden, was die Hälfte der Zeit einspart - erheblich. Auch die Kosten werden um mehr als die Hälfte gesenkt, denn die Detektion der Normalisierungs-Luziferase macht den Verbrauch eines speziellen Substrats nötig und dieses ist teuer.

### 4.1.2 Vergleich der konstruierten Reportergenplasmide

Es wurden vier TRE-tragende T<sub>3</sub>-Reportergenplasmide auf Basis des Vektors pGL3-Promoter konstruiert und durch Sequenzierung überprüft (Abb. 8-12). Beim funktionellen Test dieser Plasmide durch Transfektion nach einem zunächst optimierten Protokoll (Abb. 14, 15 und Tabelle 10) und nachfolgende T<sub>3</sub>-Stimulation von HepG2 Zellen zeigten die Plasmide eine unterschiedlich starke Responsivität für T<sub>3</sub> (Abb. 16). Da p(negTRE)<sub>1</sub>-SV40-*luc*+ und p(negTRE)<sub>3</sub>-SV40-*luc*+ ebenso wie das Kontrollplasmid pGL3-Promoter ohne TRE-Insert keine statistisch signifikante T<sub>3</sub>-Regulation zeigten wurden sie für die weiteren Experimente nicht mehr eingesetzt. Zur Untersuchung von negativen TRE im Rahmen eines neuen Projektes könnte die Weiterarbeit mit und die Modifizierung von p(negTRE)<sub>1</sub>-SV40-*luc*+ und p(negTRE)<sub>3</sub>-SV40-*luc*+ jedoch sehr lohnend sein. Das Konstrukt p(DR4)<sub>1</sub>-SV40-*luc*+ wurde durch 10 nM T<sub>3</sub> 1,6-fach induziert, doch wurde zur weiteren Optimierung p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ ausgewählt, da dieses Plasmid die stärkste Induktion (2x im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle) in diesem ersten Experiment zeigte.

### 4.1.3 Stabil transfizierte Reporterenzellen

Parallel zum Aufbau eines T<sub>3</sub>-Reportergenassays, der auf transient transfizierten Zellen basiert, wurde auch eine Strategie zur stabilen Transfektion mit einem T<sub>3</sub>-Reportergenplasmid verfolgt. Weil pGL3-Promoter keinen geeigneten Selektionsmarker zur Etablierung stabil transfizierter Zellen trägt, wurde eine Serie von Reportergenplasmiden auf dem Hintergrund des Plasmides pBK-RSV konstruiert, das einen solchen Selektionsmarker besitzt (Abb. 13). Der Test durch transiente Transfektion und T<sub>3</sub>-Inkubation zeigte jedoch, dass die konstruierten Plasmide zwar Luziferase exprimierten, jedoch keine T<sub>3</sub>-Responsivität besaßen (Abb. 17). Deshalb konzentrierten sich die weiteren Arbeiten auf die Optimierung des Reportergensystems mit transienter Transfektion. Dennoch wäre die Etablierung von stabil transfizierten T<sub>3</sub>-Reporterenzellen in nachfolgenden Arbeiten wünschenswert. Der Vorteil von stabil transfizierten T<sub>3</sub>-Reporterenzellen läge in einer Vereinfachung und Verkürzung der Arbeitsschritte zur Durchführung des Assays. Zudem würde die Arbeit mit stabil transfizierten T<sub>3</sub>-Reporterenzellen die Kosten des Assays senken, da die transienten Transfektionen nicht mehr nötig wären. Solch ein System ließe sich vermutlich auch leichter in anderen Labors einführen oder sogar vermarkten. Jedoch könnten auch Nachteile entstehen. Denn, wie der Vergleich von Einzeltransfektionen des Reportergenkonstrukts mit TR-Kotransfektionsexperimenten in unterschiedlichen Zellen zeigte (Abb. 18), ist die Maximalinduktion des Reportergens mit den endogenen TR der Zellen alleine wesentlich geringer und der dynamische Bereich viel kleiner als

bei Kotransfektion mit TR-Expressionskonstrukten. Das lässt vermuten, dass auch für stabil transfizierte T<sub>3</sub>-Reporterzellen die Überexpression von TR nötig wäre, man also doppelt stabil transfizierte Zellen generieren müsste. Bei der Arbeit mit solchen T<sub>3</sub>-Reporterzellen müsste man eine zuverlässige Methode zur Überprüfung der Konsistenz der T<sub>3</sub>-Responsivität über die Zeitspanne der Verwendung durchführen, denn es kommt nicht selten vor, dass stabil transfizierte Zellen unter bestimmten Umständen und nach gewisser Kultivierungszeit ihre Transgene verlieren. Um dies zu verhindern, übt man typischerweise durch Verwendung entsprechender Antibiotika einen Selektionsdruck auf den Erhalt des Transgens aus. Diese Antibiotika könnten jedoch störend auf die Untersuchungen mit dem Reportergenassay wirken, indem sie beispielsweise mit den Testsubstanzen interferieren oder reagieren. Deshalb sollte das Screening von ED in Abwesenheit von Selektions-Antibiotika stattfinden. Jedoch ist unklar, wie lange vor dem Screening die Antibiotika abgesetzt werden müssten, um eine Verfälschung des Testausgangs ausschließen zu können und ob es während dieser Zeit aufgrund des fehlenden Selektionsdrucks für das Transgen nicht zu einer Veränderung der T<sub>3</sub>-Responsivität kommen könnte.

Es könnte zudem ein Problem damit geben, Zellen mit stabil transfizierten TR zu etablieren, zumindest hatten einige Kollegen damit aufgrund einer beobachteten Toxizität bisher keinen Erfolg (Baniahmad A, persönliche Kommunikation). Dies kann aber auch mit den verwendeten Plasmiden oder Zellen zusammenhängen, denn mit PC12 Zellen gelang die stabile Überexpression von TR durch eine initiale retrovirale Infektion (Munoz et al. 1993). Retroviral transfizierte Zellen stellen aber insofern einen Nachteil dar, als dass sie sich nur in wenigen Labors verwenden lassen, weil für den Umgang mit solchen in dieser Weise gentechnisch veränderten Organismen eine spezielle behördliche Erlaubnis nötig ist, die nur wenige Labors besitzen.

#### **4.1.4 Vergleich von Zelllinien**

Es war zu vermuten, dass verschiedene Zelltypen sich unterschiedlich gut für die Verwendung im T<sub>3</sub>-Reportergenassay eignen würden. Transfektionsexperimente mit verschiedenen Zelllinien mit Einzeltransfektion des Reportergenplasmids p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc*+ oder Kotransfektion mit pRS-rTR $\alpha_1$  und Inkubation in An- oder Abwesenheit von 100 nM T<sub>3</sub> zeigten deutliche Unterschiede bezüglich der Reportergenaktivität und T<sub>3</sub>-Responsivität (Abb. 18). In manchen Zellen, wie der Nieren-Zelllinie HEK 293, war in Einzeltransfektionen mit dem Reportergen keine T<sub>3</sub>-abhängige Änderung der basalen Luziferase-Aktivität zu beobachten. Das könnte an dem Fehlen funktionell aktiver TR liegen, zumal die Kotransfektion mit pRS-rTR $\alpha_1$  zu einer rund 6-fachen Induktion des Reportergens führte. In anderen Zellen wurde die Reportergenaktivität

bei Einzeltransfektion nur schwach induziert (2-fach bei Cos-7) während in HepG2 Induktionen von ca. 5-fach gemessen wurden. Bei fast allen Zelllinien (bis auf FTC-133) konnte die Kotransfektion mit  $rTR\alpha_1$  die Responsivität deutlich steigern. Die mit 32-fach über Kontrollwert stärkste Induktion wurde mit kotransfizierten HepG2 erreicht.

HepG2 Zellen gehören zu den bevorzugten humanen *in vitro* Modellen, die häufig für Metabolismusstudien verwendet werden und die Leber ist ein klassisches Zielorgan von  $T_3$  (Wilkening et al. 2003; Brandon et al. 2006). Außerdem weisen HepG2 Zellen einige wichtige TH-metabolisierende Enzyme auf, z. B. haben sie eine starke DIO-Aktivität (Kester et al. 2006). Daher erschienen HepG2 Zellen am besten geeignet für den Reporteragenassay und wurden für weitere Optimierungen ausgewählt.

### 4.1.5 Vergleich von TR

Beim Vergleich von Expressionsplasmiden verschiedener TR-Isotypen und -Isoformen wurden Unterschiede in der Induzierbarkeit durch  $T_3$  deutlich (Abb. 23). So zeigte die Kotransfektion mit unterschiedlichen TR-Expressionsplasmiden, dass mit  $cTR\alpha_1$  die höchsten RLU erzielbar waren (Abb. 23A). Jedoch war kaum eine  $T_3$ -Dosisabhängigkeit der Luziferase-Aktivität zu verzeichnen. Zudem trat durch Kotransfektion mit  $cTR\alpha_1$  nicht die zu erwartende Repression in Bezug auf die Einzeltransfektion mit  $p(DR4)_2$ -SV40-*Luc*+ in Abwesenheit von  $T_3$  ein. Die Kotransfektion mit  $rTR\beta_1$  führte zu RLU, die sich kaum von der Einzeltransfektion mit dem Reporteragenplasmid unterschieden. Auch hier trat die Repression durch TR-Kotransfektion unter der  $T_3$ -freien Bedingung nicht ein und eine Dosisabhängigkeit war nur gering ausgeprägt. Anders stellte sich die Situation bei der Kotransfektion mit  $rTR\alpha_1$  und  $hTR\beta_1$  dar. Diese Kotransfektionen erzielten hohe RLU, die zwar geringer waren als mit  $cTR\alpha_1$ -Transfektion, aber eine deutliche  $T_3$ -Dosisabhängigkeit zeigten. Außerdem zeigte sich bei der Kotransfektion dieser TR die typische Repression in Abwesenheit von  $T_3$  und eine starke Derepression in Anwesenheit von  $T_3$ . Dabei erzielte die Kotransfektion mit  $rTR\alpha_1$  höhere RLU und stärkere Induktionen als  $hTR\beta_1$  (Abb. 23B). Deshalb wurde vorwiegend mit  $rTR\alpha_1$ -Kotransfektion gearbeitet. Zur Überprüfung wurden manche Experimente auch mit  $hTR\beta_1$ -Kotransfektion durchgeführt. Die hier beobachteten Unterschiede der TR-Expressionsplasmide hängen vermutlich zum großen Teil mit dem jeweiligen Ausgangs-Plasmid für die TR-Inserts zusammen. Denn die Bindungsaffinitäten von  $TR\alpha_1$  und  $TR\beta_1$  sind sehr ähnlich ( $K_d$   $10^{-9}$  -  $10^{-10}$ ) (Munoz et al. 1988; Schwartz et al. 1992) und bisher konnten auch keine Gen-spezifischen transkriptionellen Unterschiede zwischen den verschiedenen TR-Isotypen und -Isoformen festgestellt werden (Oetting und Yen 2007). Diese

Ergebnisse zeigen in deutlicher Weise, dass der hier entwickelte T<sub>3</sub>-Reporterassay auch für andere wissenschaftliche Fragestellungen ein gutes Werkzeug darstellt. Für den Aufbau des ED-Screening-Assays lag der Fokus jedoch auf der Identifizierung eines TR-Expressionsplasmids, das eine physiologische Reaktion auf T<sub>3</sub> zeigt und eine sensitive und hoch-dynamische Messung von Testsubstanzen erlaubt. In den Expressionsplasmiden von rTR $\alpha_1$  und hTR $\beta_1$  wurden solche Plasmide gefunden.

### 4.1.6 Ermittlung der optimalen Inkubationsdauer

In Zeitreihenexperimenten wurde das Profil der T<sub>3</sub>-Dosis-Wirkung in diesem System untersucht. Hierzu wurden T<sub>3</sub>-Dosis-Wirkungskurven mit Konzentrationen von 10<sup>-11</sup> bis 10<sup>-7</sup> M T<sub>3</sub> nach 2, 4, 6, 12 und 24 h Inkubation gemessen und verglichen (Abb. 19). Schon nach 2 h waren dosisabhängige Induktionen durch T<sub>3</sub> messbar und mit steigender Inkubationsdauer wurden diese stärker bis Maximalinduktionen von über 30-fach relativ zur Lösungsmittelkontrolle nach 24 h erreicht wurden. Diese Inkubationsdauer erschien deshalb optimal für weitere Experimente, weil sie den größten dynamischen Bereich aufwies. Um den Zeitaufwand für den Assay möglichst gering zu halten und sekundäre Effekte, die z. B. durch Proliferation der Zellen auftreten könnten, zu vermeiden, wurden längere Inkubationszeiten ausgeschlossen. Proliferationseffekte wurden außerdem unterdrückt, indem die Zellen bereits in einer Zellzahl auf die Messplatten transferiert wurden, die der einer konfluenten Zellschicht entsprach.

Experimente zur Feststellung der nötigen Präinkubationsdauer mit den Testsubstanzen bei T<sub>3</sub>-Kompetitionsassays (nicht gezeigt) führten zu der Erkenntnis, dass die Zellen direkt mit den Substanzen und T<sub>3</sub> inkubiert werden können und eine Vorinkubation nicht nötig ist.

### 4.1.7 Effekte von Zellkulturmedium

Um die Basalwerte des T<sub>3</sub>-Reporterassays zu minimieren und damit den dynamischen Bereich und die Sensitivität des Assays zu erhöhen, wurde die Hintergrundaktivität bei der Verwendung unterschiedlicher Medien untersucht. Es stellte sich heraus, dass minimale Basalwerte unter Verwendung von nicht-supplementiertem, phenolrotfreiem DMEM zu erzielen waren (Abb. 20). Seit 1986 ist bekannt, dass der in der Zell- und Gewebekultur verwendete pH-Indikator Phenolrot schwach östrogen wirkt (Berthois et al. 1986). Später wurde ein Kontaminant der Phenolrotproduktion, bis-(4-hydroxyphenol)-[2-phenoxysulfonyl]phenol] Methan, als die eigentliche östrogene Komponente identifiziert (Bindal und Katzenellenbogen 1988). Auch in diesem Assay hatte Phenolrot einen Einfluss. Die Werte bei Inkubation der

Zellen in phenolrothaltigem DMEM waren 1,8-fach höher als die Werte von phenolrotfreiem DMEM (Abb. 20B). Die Verwendung von DMEM, das mit 10 % FBS supplementiert war, erwies sich ebenfalls als ungünstig, da der Basalwert um das 3,4-fache gegenüber DMEM erhöht wird. Fötales bovines Serum, das als Supplement von Zellkulturmedien weite Verbreitung findet und quasi ein Standardsupplement darstellt, enthält laut Herstellerangaben schwankende  $T_3$ -Konzentrationen von etwa 90 pM bis 3,5 nM (Invitrogen). Im Medium mit einem Supplement von 10 % FBS wären das also 9 bis 350 pM. Bei dem Mediumvergleich mit dem Reportergensystem liegen die RLU der Ansätze mit DMEM + 10 % FBS minimal über denen, die mit 100 pM  $T_3$  in DMEM erreicht werden und deutlich unter denen von 300 pM  $T_3$  in DMEM. Somit decken sich die Ergebnisse mit den Serumwerten der Herstellerangaben. Die Verwendung von FBS, dessen Hormonspiegel durch Aktivkohle/Dextran-Behandlung vermindert wurden (hormongestripptes FBS), wirkt sich nur minimal auf die Basalwerte im Reportergenassay aus. Die Werte liegen 2,8-fach höher als die DMEM-Werte. Es wurden auch unterschiedliche Spezialmedien zur serumfreien Kultivierung von Zellen getestet. Diese scheinen sich jedoch alle durch den Zusatz relativ hoher  $TH$ -Konzentrationen auszuzeichnen. Da es sich um urheberrechtlich geschützte Zusammensetzungen handelt, sind keine Herstellerangaben verfügbar. Im  $T_3$ -Reportergenassay lagen die Werte jedoch noch höher als bei Verwendung von FBS-supplementiertem DMEM und waren vergleichbar mit dem Effekt von 300 nM  $T_3$  in DMEM. Das Zellkulturmedium UltraCULTURE erbrachte sogar noch stärkere Induktionen der Reportergenaktivität von 7-fach im Vergleich zu DMEM (Abb. 20B). Die getesteten Spezialmedien bringen also für diesen Assay keine Vorteile verglichen mit DMEM + 10 % FBS. Beim direkten Vergleich der  $T_3$ -Dosis-Wirkungskurve in DMEM ohne Supplemente und DMEM + 10 % hormongestrippten FBS wurden mit dem gestrippten FBS nicht nur geringere Induktionen gemessen, sondern auch der  $EC_{50}$ -Wert in hTR $\beta_1$ -kotransfizierten HepG2 von 1,6 auf 7,8 nM verschoben (s. Anhang Abb. 38). Zusammengefasst ist das in einem solchem Reportergenassay benutzte Zellkulturmedium also von entscheidender Bedeutung für den dynamischen Bereich und die Sensitivität des Assays. Für optimierte Assays wurden die Zellen daher in DMEM + 10 % FBS angezogen und transfiziert, zur Inkubation mit den Testsubstanzen aber nach einem einstündigen Waschschrift in DMEM ohne weitere Supplemente inkubiert.

### 4.2 Validierung des Systems

#### 4.2.1 Validierung mit synthetischen Agonisten/Antagonisten

Der T<sub>3</sub>-Reporterassay wurde zur Untersuchung exogener Chemikalien etabliert. Um das System zu validieren und seine Eignung zur Analyse der Aktivitäten potenzieller ED zu prüfen, wurden synthetische Agonisten und ein Antagonist verwendet. Durch Aufzeichnung der Dosis-Wirkungskurven dieser Substanzen bei Einzelapplikation und bei Konkurrenz mit 1 nM T<sub>3</sub> sollte auch eine Charakterisierung von T<sub>3</sub>-agonistischen und -antagonistischen Effekten durchgeführt werden. Es wurde die Inkubation mit 1 nM T<sub>3</sub> für Konkurrenzexperimente gewählt, weil diese Konzentration zum einen der physiologischen Situation im humanen Serum und zum anderen dem EC<sub>50</sub>-Wert in diesem Reporterassay (Abb. 24B) entspricht. Der synthetische Agonist GC-1 (Chiellini et al. 1998) hatte bei rTR $\alpha_1$ -Kotransfektion eine Dosis-Wirkungskurve mit Maximalinduktionen von ca. 80-fach relativ zur Lösungsmittelkontrolle und einen EC<sub>50</sub>-Wert von 22 nM (Abb. 25B).

Um zu überprüfen, welche Wirkung ein typischer TR-Agonist im T<sub>3</sub>-Konkurrenzassay entfaltet, wurde GC-1 auch in diesem Assay getestet. GC-1 induzierte das Reporterassay im T<sub>3</sub>-Konkurrenzassay ab einer Konzentration von 10 nM – also einem zehnfachen molaren Überschuss im Vergleich zu T<sub>3</sub> – signifikant gegenüber der basalen Induktion von T<sub>3</sub> und erreichte Maximalinduktionen von 3,2-fach verglichen mit 1 nM T<sub>3</sub> (Abb. 25C). Der EC<sub>50</sub>-Wert lag bei 24 nM, ist also vergleichbar mit dem EC<sub>50</sub>-Wert im Aktivierungsassay (Abb. 25D). GC-1 wirkt als ähnlich potenter und reiner TR-Agonist wie T<sub>3</sub>. Der Assay verhält sich also wie erwartet und kann T<sub>3</sub>-mimetische Effekte synthetischer Substanzen erfassen. Für die Interpretation der Konkurrenzassays bedeuten diese Ergebnisse, dass induzierende Effekte einer Testsubstanz im T<sub>3</sub>-Konkurrenzassay erfasst werden, wenn die Substanz in einer der getesteten Konzentrationen eine stärker aktivierende Wirkung als 1 nM T<sub>3</sub> hat. Ist die agonistische Wirkung der Testsubstanz in allen getesteten Konzentrationen geringer als die von 1 nM T<sub>3</sub>, so wird sie im Konkurrenzassay durch den T<sub>3</sub>-Effekt überspielt und nicht detektiert, sofern die Testsubstanz in den getesteten Konzentrationen T<sub>3</sub> nicht kompetitiv vom TR verdrängen kann. Der agonistische Effekt wird dann nur im Aktivierungsassay festgestellt. Wenn die Testsubstanz im Aktivierungsassay agonistisch, aber im T<sub>3</sub>-Konkurrenzassay antagonistisch wirkt, kann dieser gemischt agonistische/antagonistische Effekt dahin gehend interpretiert werden, dass die Substanz eine schwächere agonistische Potenz aufweist als T<sub>3</sub>, aber in der Lage ist, T<sub>3</sub> kompetitiv aus der Bindung zu TR zu verdrängen.

Zur weiteren Charakterisierung des Assays wurde der T<sub>3</sub>-Antagonist NH-3 (Lim et al. 2002) verwendet. NH-3 reprimierte im T<sub>3</sub>-Konkurrenzexperiment die Aktivierung des

Reportergens durch 1 nM  $T_3$  ab einer Konzentration von 100 nM statistisch signifikant (Abb. 26C). Das entspricht einem molaren Verhältnis  $[T_3]:[NH-3]$  von 1:50. Die maximale Repression wurde mit 13 % der Werte von 1 nM  $T_3$  bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M NH-3 erreicht. Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei 100 nM. Bei Einzelapplikation von NH-3 im Aktivierungsassay wirkte es jedoch agonistisch und induzierte die Reporterogenaktivität bis zum 2,6-fachen der Kontrollwerte. Eine statistisch signifikante Induktion wurde ab 500 nM gemessen und der  $EC_{50}$ -Wert war mit 81 nM vergleichbar mit dem  $IC_{50}$ -Wert (Abb. 26D). NH-3 wirkt demzufolge also als kompetitiver TR-Ligand, der alleine schwach agonistisch ist, aber durch kompetitive Verdrängung von  $T_3$  bei einer physiologischen  $T_3$ -Konzentration einen antagonistischen Effekt hat. Somit ist NH-3 in diesem System ein gemischter  $T_3$ -Agonist/Antagonist. Aufgrund des geringen Aktivierungspotenzials wird NH-3 von Nguyen et al. jedoch als purer Antagonist gewertet (Nguyen et al. 2002; Nguyen et al. 2005). Erst in wenigen weiteren Publikationen wird auch auf die agonistischen Effekte von NH-3 in vergleichbaren Konzentrationen von ca. 1  $\mu$ M hingewiesen (Opitz et al. 2006b). Diese Arbeiten unterstützten die hier gewonnenen Ergebnisse. NH-3 ist ein Derivat von GC-1 und es kann deshalb nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass Kontaminationen der Ausgangssubstanz GC-1 zu diesem agonistischen Effekt beitragen. Jedoch ist auffällig, dass die  $EC_{50}$ - und  $IC_{50}$ -Werte von NH-3 eng beieinanderliegen, was für einen spezifischen Effekt spricht (Abb. 26C, D). In Bezug auf die Validierung des Assays zeigen die Ergebnisse mit NH-3 deutlich, dass das Verfahren beim  $T_3$ -Kompetitionsassay sehr gut für die Detektion von antagonistischen Effekten der Testsubstanzen geeignet ist.

Bei hTR $\beta$ -Kotransfektion hat GC-1 einen niedrigeren  $EC_{50}$ -Wert von 0,7 als im TR $\alpha$ -System, was seine bekannte  $\beta$ -Selektivität unterstreicht (Chiellini et al. 1998). NH-3 hat ebenfalls eine leichte Präferenz für TR $\beta$ -Bindung (Nguyen et al. 2002), was sich durch einen moderat erniedrigten  $IC_{50}$ -Wert bei hTR $\beta_1$ -Transfektion andeutet. Der synthetische TR-Agonist GC-24 führte zu sigmoidalen Dosis-Wirkungskurven und zeichnete sich durch einen berechneten  $EC_{50}$ -Wert von 19 nM aus.

Zusammengefasst konnte mithilfe dieser Referenzsubstanzen nachgewiesen werden, dass mit dem hier entwickelten TH-Reportersystem sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte von exogenen Substanzen sensitiv erfasst werden können und dass es sich deshalb für die Analyse von Testsubstanzen und das geplante ED-Screening eignet.



### 4.2.2 Validierung mit Schilddrüsenhormonmetaboliten

Es wurden auch TH-Metaboliten als Referenzsubstanzen untersucht. TRIAC ist bereits als TR-Agonist bekannt (Wu et al. 2005; Flamant et al. 2006) und induzierte die Luziferase-Aktivität in diesem Assay maximal ca. 60-fach (Abb. 28A). Dabei hatte die Dosis-Wirkungskurve einen  $EC_{50}$ -Wert von 50 nM (Abb. 28B); TRIAC war also um mehr als eine Größenordnung weniger potent als  $T_3$ . Da die publizierten Serumwerte von TRIAC mit 2,8 nM (Chopra et al. 1992) in etwa äquimolar mit denen von  $T_3$  (2,1 nM) (Nicoloff et al. 1972; Suda et al. 1978) sind, stellt sich die Frage, ob TRIAC *in vivo* zur biologischen Wirkung beiträgt, oder ob seine Effekte völlig von der  $T_3$ -Wirkung überdeckt werden. Bisher konnte  $T_3$ AM noch keine  $T_3$ -verwandte biologische Wirkung zugeordnet werden (Meyer und Hesch 1983; Cody et al. 1984). Im Reporteragenassay zeigte  $T_3$ AM eine sigmoidale Dosis-Wirkungskurve mit Maximalinduktionen von ca. 60-fach, jedoch war der  $EC_{50}$ -Wert mit 117 nM im Vergleich zu TRIAC nach rechts verschoben (Abb. 28C, D). Es gibt Hinweise, dass  $T_3$ AM zu TRIAC metabolisiert wird, sodass man hier vermutlich den Effekt von TRIAC sieht (Scanlan TS, persönliche Kommunikation). Bei dem Vergleich von  $T_0$  und verschiedenen Iodthyroninen stellte sich heraus, dass alle Iodthyronine mit einer Iodsubstitution in Position 3 in hoher Konzentration recht starke TR-Agonisten waren (Abb. 29). Dies wird besonders deutlich beim Vergleich der drei unterschiedlichen Diiodthyronine. So induzieren 3,3'- $T_2$  (Abb. 29C) und 3,5- $T_2$  (Abb. 29D) die Reporteragenaktivität 65-fach, wohingegen für 3',5'- $T_2$  Induktionen von nur 2-fach gemessen wurden (Abb. 29E). Da die hier getesteten Iodthyronine *in vivo* in zum größten Teil erheblich geringerer Konzentration als  $T_3$  auftreten (Burman et al. 1977), liegt die Annahme nahe, dass die beobachteten Effekte bei hohen Konzentrationen im Luziferase-Assay vermutlich von der  $T_3$ -Wirkung im intakten Organismus überspielt werden. Für manche dieser Substanzen gibt es jedoch auch unterschiedliche Hinweise bezüglich ihrer Wirkung *in vivo*.

So war lange Zeit wenig über die Biologie von 3,5- $T_2$  bekannt und es galt als inaktives Deiodierungs-Nebenprodukt von  $T_3$  (Goglia 2005). Dann wurde die schnelle und nicht-genomische stimulierende Wirkung von 3,5- $T_2$  auf die mitochondriale respiratorische Rate und die oxidative Kapazität durch Induktion von Atmungskette, Sauerstoffverbrauch und Cytochrom Oxidase Aktivität bekannt (Horst et al. 1989; Lombardi et al. 1998; Lanni et al. 1994). 3,5- $T_2$  beeinflusst fast ebenso aktiv die Lipolyse wie  $T_3$  (Mandel und Kuehl, Jr. 1967). Einige  $T_3$ -Zielgene werden auch durch 3,5- $T_2$  reguliert und die Bindung an TR wurde nachgewiesen, obgleich 3,5- $T_2$  hier um eine bis drei Größenordnungen weniger potent ist als  $T_3$  (Baur et al. 1997; Ball et al. 1997). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit gibt nun weitere Hinweise auf eine Interaktion von 3,5- $T_2$  und TR. Auch hier ist 3,5- $T_2$  erst in einem

Konzentrationsüberschuss von zwei bis drei Größenordnungen fähig, mit  $T_3$  vergleichbare Induktionen im Transaktivierungsassay zu erzielen. Eine aktuelle Publikation zeigt, dass 3,5- $T_2$  die Bindung nukleärer Proteine an ein TRE (DR4) fördert, was eine genomische Wirkung impliziert (Garcia et al. 2007). Da die physiologische Serum-Konzentration 3,8 bis 14 pM beträgt (Engler et al. 1984), tritt dieser Effekt aber vermutlich in den Hintergrund der  $T_3$ -Wirkung, sofern nicht ein unterschiedlicher Mechanismus der Interaktion vorliegt.

Über die biologische Bedeutung von 3,3'- $T_2$  ist weniger bekannt. Es scheint auf ähnliche Weise wie 3,5- $T_2$  durch einen nicht-genomischen Mechanismus die mitochondriale Aktivität zu erhöhen (Lanni et al. 1992; Lanni et al. 1993) und seine Serum-Konzentration liegt bei 19 bis 150 pM (Faber et al. 1979). Daneben stimuliert es die Aufnahme von Aminosäuren in Thymozyten etwa dreimal so potent wie  $T_4$  (Goldfine et al. 1976). Der transaktivierende Effekt im  $T_3$ -Reporterassay (Abb. 29C) stellt eine neue Beobachtung dar.

Das Iodthyronin 3',5'- $T_2$  ist ein Inhibitor der Deiodierung von  $T_4$  zu  $T_3$  in Leber- und Nieren-Homogenaten (Chopra 1977). Die Serum-Konzentration von 3',5'- $T_2$  beträgt 30 bis 170 pM (Chopra et al. 1978). Die transkriptionelle Aktivität bei einer Konzentration ab 3  $\mu$ M ist mit einer ca. 2-fachen Induktion sehr gering und kommt *in vivo* vermutlich nicht zum Tragen.

Über 3- $T_1$  gibt es nur wenige Daten über Serum-Konzentrationen, die mit 13 bis 190 pM angegeben werden (Corcoran und Eastman 1983). Besonders interessant ist das Ergebnis, dass 3- $T_1$  im Reporterassay als gemischter Agonist/Antagonist wirkte (Abb. 29B). Dies deutet auf eine  $T_3$ -kompetitive Interaktion mit TR hin und macht 3- $T_1$  somit zu einem spannenden Kandidaten für Untersuchungen *in vivo*. Durch gezielte Tierexperimente könnte analysiert werden, ob 3- $T_1$  unter bestimmten physiologischen Umständen, wie Entwicklung oder Krankheit, oder in bestimmten Organen bzw. Kompartimenten, einen regulativen Einfluss auf das TH-System und  $T_3$ -Zielgene hat.

Obwohl  $rT_3$  als biologisch weitgehend inaktiv gilt, zeigt es in unterschiedlichen *in vitro* Assays teils agonistische, teils antagonistische Wirkungen in vorwiegend pharmakologischen Konzentrationen (Papavasiliou et al. 1977). Über die Existenz hochaffiner Bindungsstellen für  $rT_3$  in hepatischen Zellkernen herrscht noch Unklarheit (Smith et al. 1980; Wiersinga et al. 1982). *In vitro* ist  $rT_3$  ein potenter Inhibitor der Deiodierung von  $T_4$  zu  $T_3$  und übt *in vivo* möglicherweise eine regulatorische Aufgabe als kompetitiver Inhibitor von DIO1 aus und könnte an der Embryonalentwicklung beteiligt sein (Köhrle et al. 1986). Seine Serum-Konzentration beträgt 22 bis 620 pM (Faber et al. 1981; Chopra 1976). Unter normalen Bedingungen wird  $rT_3$  sehr schnell abgebaut (Dunn und STANBURY 1958), kann jedoch unter pathologischen Umständen

deutlich erhöht sein (Chopra et al. 1975). Die hier gemachte Beobachtung, dass  $rT_3$  in mikromolarer Konzentration stark transaktivierend auf das  $T_3$ -Reporter gen wirkte, wirft im Zusammenhang mit den Berichten aus der Literatur die Frage auf, ob  $rT_3$  trotz der benötigten hohen Wirkkonzentration vielleicht nicht nur ein TH-Inaktivierungsprodukt ist, sondern auch zur biologischen Wirkung von  $T_3$  beiträgt.

Diese Daten zeigen, dass der etablierte  $T_3$ -Reporter gen assay auch zur Detektion und Untersuchung von TH-Metaboliten geeignet ist und eröffnen somit neue Einsatzgebiete des Assays. Eine Kontamination der Iodthyronine mit  $T_3$  und ein daher rührender unspezifischer Effekt können ausgeschlossen werden, weil die Reinheit der hier verwendeten Aliquots durch Analysen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatografie mit gekoppelter Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS) nachgewiesen werden konnte (Piehl S, persönliche Kommunikation).

### 4.2.3 Vergleich mit anderen $T_3$ -Reporter gen assays

Unter Berücksichtigung der durch die Optimierung gewonnen Erkenntnisse wurden bei Kotransfektion mit  $rTR\alpha_1$  sigmoidale  $T_3$ -Dosis-Wirkungskurven mit einer Maximalinduktion von über 100-fach relativ zur Lösungsmittelkontrolle und  $EC_{50}$ -Werten von 1,2 nM gemessen (Abb. 24A, B). Statistisch signifikante Induktionen in Bezug auf die Kontrolle waren vereinzelt schon bei 10 pM  $T_3$ , in allen Fällen aber ab 100 pM  $T_3$  zu messen (Abb. 24A). Bei Kotransfektion von  $p(DR4)_2$ -SV40-*luc*+ mit  $hTR\beta_1$  wurden Induktionen von über 20-fach erreicht und die  $EC_{50}$ -Werte lagen bei 1,6 nM, waren also vergleichbar mit  $rTR\alpha_1$  (Abb. 24C, D).

In der Literatur sind zahlreiche  $T_3$ -Reporter gen assays beschrieben, die auf unterschiedlichen Zelllinien, Reporter gen konstrukten, Kotransfektionen sowie Normalisierungen fußen und unter verschiedenen experimentellen Bedingungen durchgeführt wurden. Der Vergleich wird durch diese vielfältigen Variablen erschwert, jedoch fällt die Maximalinduktion durch  $T_3$  für Reporter gen konstrukte zumeist recht gering aus und bewegt sich im Bereich bis ca. 10-fach über der basalen Luziferase-Aktivität (Katz und König 1993; Katz und König 1994; Jakobs et al. 1997; Weitzel et al. 2001a; Kuno-Murata et al. 2000; Shi et al. 2005; Yamada-Okabe et al. 2003; Weber et al. 2002). In manchen  $T_3$ -Reporter gen assays wurden unter Verwendung synthetischer TRE Induktionen bis ca. 25-fach erreicht (Furrow und Brown 1999; Kitamura et al. 2005; Jagan et al. 2007). Auch durch das erreichte Detektionslimit und die Reproduzierbarkeit (Abb. 24A, B) zeichnet sich der hier entwickelte Assay aus.

### 4.3 Limitationen und Vorteile des Assays

#### 4.3.1 HepG2 als Zellmodell

Einige ED stehen im Verdacht, über ihre Metaboliten zu wirken. Mit einem Zellsystem lässt sich aber die Metabolisierung von Chemikalien im intakten Organismus nur bedingt darstellen. HepG2 Zellen gehören zu den bevorzugten humanen *in vitro* Zellmodellen, die häufig für Metabolismusstudien verwendet werden (Wilkening et al. 2003; Brandon et al. 2006). Weil sie von hepatischen Zellen abgeleitet sind, scheinen HepG2 Zellen eine recht gute Wahl bezüglich dieser Problemstellung darzustellen, können aber sicher nicht als Modell für alle metabolischen Modifizierungen von ED dienen. Es ist bekannt, dass HepG2 eine Vielzahl von Phase I Enzymen exprimieren, so z. B. die Cytochrom P450 Enzyme (CYP 1A1, 1A2, 2B6, 2C9, 2D6, 2E1, 3A7), jedoch auf einem niedrigeren Level als primäre humane Hepatozyten und CYP 3A4 konnte nicht nachgewiesen werden (Wilkening et al. 2003). Andere Gene metabolisierender Enzyme werden in HepG2 Zellen höher exprimiert als in primären humanen Hepatozyten, z. B. die Sulfotransferase SULT 1A1, NAT1 (N-Acetyltransferase 1) und NQO1 (Chinon Oxidoreduktase 1). Außerdem werden von HepG2 z. B. die Phase II Enzyme UDP-Glucuronosyltransferase 1A1, 2B7 und 1A6 (UGT1A1, UGT2B7, UGT1A6) sowie die Sulfotransferase 1E1 (SULT 1E1) exprimiert (Wilkening et al. 2003; Lancon et al. 2007). Die Regulation dieser Phase I und II Gene erfolgt ähnlich wie in primären humanen Leberzellen, was zusammengekommen für HepG2 Zellen als Modell für Metabolismusstudien spricht (Wilkening et al. 2003). Aussagen über die Aufnahme, die Metabolisierung und Stabilität der Testsubstanzen in HepG2 Zellen können für die meisten der getesteten ED nicht getroffen werden. Jedoch gibt es publizierte Daten für die Aufnahme von vielen der getesteten ED. Für RES ist bekannt, dass es aufgenommen und innerhalb von 8 h metabolisiert wird (Latruffe et al. 2002; Lancon et al. 2007).

Theoretisch könnten ED auch die zelluläre Aufnahme von T<sub>3</sub> beeinflussen, indem sie z. B. MCT8 oder MCT10 inhibieren. Diese Überlegung könnte zu Bedenken führen, dass Effekte, die in T<sub>3</sub>-Kompetitionsassays zu beobachten sind, auch auf eine Hemmung der zellulären Aufnahme von T<sub>3</sub> durch die ED zurückzuführen sein könnten. Diese Bedenken können aber ausgeräumt werden, da für die Assays eine Inkubationszeit von 24 h gewählt wurde und sich der Transmembrantransport dann schon längst im Equilibrium befindet.

HepG2 stammen von einem männlichen Spender. Somit kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte auch für weibliche Organismen gelten. Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass vor einem weiblichen Hintergrund andere Effekte eintreten würden, denn die Grundkomponenten des

Reportergensystems (Reportergenplasmid, TR, CoA, CoR, basale Transkriptionsmaschinerie etc.) sind in beiden Geschlechtern vorhanden. Aufgrund der zunehmenden Erkenntnisse um geschlechtsspezifische Effekte in verschiedensten physiologischen Prozessen und in der medizinischen Versorgung ist ein Grundinteresse an der Differenzierung der Wirkungen von Testparametern auf weibliche und männliche Organismen jedoch geweckt. Um diesem Interesse gerecht zu werden, könnte ein weiteres Zelllinien-Screening auch geeignete, von weiblichen Spendern abstammende Zell-Modelle zur Klärung geschlechtsspezifischer Effekte identifizieren. Jedoch würde sich für eine solche Fragestellung zweifellos ein Tiermodell besser eignen.

Zusammengefasst scheinen HepG2 Zellen ein valides und gutes Modell für den T<sub>3</sub>-Reportergenassay darzustellen.

### 4.3.2 Sekundäre Effekte der Testsubstanzen

Wie schon erwähnt, kann ein Zell-basierter Assay nur einen Teil der Komponenten eines *in vivo* Systems nachstellen. In Bezug auf metabolisierende Effekte stellen HepG2 ein gutes Modell dar, was mit zur Wahl dieser Zelllinie beigetragen hat. Da im Assay lebende Zellen verwendet werden und die Genexpression – und somit auch die Luziferase-Expression – von Zellvitalität und einem ungestörten Zellmetabolismus abhängen, kann nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Effekte ausschließlich auf die TR-vermittelte T<sub>3</sub>-Reportergenaktivität zurückzuführen sind. Die Effekte könnten auch durch sekundäre Wirkungen der Testsubstanzen, z. B. eine toxische Wirkung, verursacht sein. Der eingangs gegebenen Definition von ED zufolge sollen die Wirkungen eines ED aber spezifisch für den untersuchten Endpunkt des Hormonsystems sein und nicht von genereller toxischer Natur. Um sekundäre Effekte, wie Toxizität, weitgehend ausschließen zu können, wurden Zellvitalitätsassays mit den Testsubstanzen durchgeführt. Mit einem Zellvitalitätsassay wird eine generelle Veränderung der Proliferation festgestellt, eine Aussage über die Beeinflussung spezieller zellulärer Signalwege kann jedoch nicht gemacht werden. Deshalb kann ein Vitalitätsassay in erster Linie nur als Ausschlusskriterium bei der Detektion eines Effekts dienen. Wird, wie bei den Experimenten dieser Arbeit, kein Effekt detektiert, so können die Testsubstanzen dennoch sekundäre Wirkungen auf verschiedene Signalwege haben.

### 4.3.3 TR-Isotypen-spezifische Effekte

TR-Isotypen-spezifische Effekte sind mit diesem Reportergenassay unter Verwendung von HepG2 nur bedingt durch Kotransfektion von entweder TR $\alpha_1$ , TR $\beta_1$  oder TR $\beta_2$  zu

untersuchen, denn HepG2 exprimieren funktionelle endogene TR (Abb. 18). Da die transfizierten TR aber im Vergleich zu den endogenen TR stark überexprimiert werden, werden die Effekte über endogene TR von den überexprimierten TR überspielt. Dadurch sind die beobachteten Effekte in der Summe spezifisch für die transfizierten TR. Um ein ganz eindeutiges System zur Untersuchung TR-Isotypen-spezifischer Wirkungen nutzen zu können, könnte man Zellen verwenden, die keine funktionellen endogenen TR exprimieren. Von den untersuchten Zelllinien würden sich zum Beispiel HEK 293 Zellen anbieten. Wie aus Abb. 18F hervorgeht, besitzen diese Zellen keine funktionellen endogenen TR und erzielen nach Kotransfektion mit TR eine recht starke Reporter-gen-Induktion. Diese Induktion ließe sich durch die oben beschriebenen Optimierungsmaßnahmen sicherlich noch deutlich steigern.

#### **4.3.4 Heterodimerisierung von TR**

Eine Eigenschaft von TR, die neue Vielfalt in das ohnehin schon komplexe System bringt, ist ihre Fähigkeit mit anderen NR, wie RXR und RAR zu heterodimerisieren. Bei Interaktion von NR-Heterodimeren mit manchen TRE sind beide Rezeptortypen responsiv für ihre jeweiligen Liganden und beeinflussen sich synergistisch (Leng et al. 1994; Force et al. 1994; Botling et al. 1997). Außerdem bedeutet dies, dass ED sowohl mit der TR- als auch der RXR-Signaltransduktion interferieren könnten und dass dies bestimmte Genloci betreffen könnte (Zoeller et al. 2007a). Solche Effekte können mit diesem System nicht erfasst werden. Auch hier könnte man mit Zelllinien ohne funktionelle endogene RXR und TR arbeiten und dann selektive RXR-Varianten mit unterschiedlichen TR-Isotypen transfizieren, um RXR-vermittelte Effekte der Testsubstanzen in Abhängigkeit von TR-Varianten zu analysieren.

#### **4.3.5 TRE-abhängige Effekte**

Eine weitere Komponente, die einen Einfluss auf die Effekte der ED haben könnte, sind die verwendeten TRE bzw. Promotoren im Reporter-gen-plasmid. Abgesehen von gegensätzlichen Regulationen bei Verwendung von positiv- oder negativ-regulierten TRE sind hier aber keine qualitativ unterschiedlichen Effekte der ED zu erwarten. Zwar ist vorstellbar, dass in Abhängigkeit vom jeweiligen TRE unterschiedliche Kofaktoren rekrutiert oder ausgetauscht werden, es ist aber zu erwarten, dass – sofern alle nötigen Komponenten in dem Zellsystem vorhanden sind – nur die Stärke der Antwort unterschiedlich ausfällt. Dasselbe gilt für die Beobachtung, dass es zwischen verschiedenen positiv-regulierten TRE einen Unterschied in Bezug auf die bevorzugte Komposition der interagierenden aktiven Rezeptoren geben kann (Velasco et al. 2007). Für einen Screening Assays können nicht alle Parameter berücksichtigt werden aber,

ob ein Agonismus oder Antagonismus auftritt, wird mit dem hier entwickelten Assay sicher und sehr sensitiv erfasst.

### 4.3.6 Neue Modelle zur Schilddrüsenhormonwirkung

Neben dem klassischen Modell der genomischen  $T_3$ -Wirkung durch TR beschreiben jüngere Modelle Membraneffekte, schnelle, nicht-genomische oder TRE-unabhängige Wirkungsweisen von Schilddrüsenhormonen. Da das TH-Reportergensystem nur TR/TRE-vermittelte Effekte detektieren kann, sind einige dieser erst in den letzten Jahren bekannt gewordenen TH-Wirkmechanismen mit diesem System nicht zu analysieren. Dazu gehören die nachfolgend beschriebenen Signalwege.

Durch Bindung an Integrin  $\alpha V\beta 3$ , das als Membranrezeptor für  $T_4$  und  $T_3$  wirkt, kann der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg angesteuert werden (Cody et al. 2007; Davis et al. 2007). Dies führt zur Phosphorylierung von nukleären Proteinen, z. B. TR und anderen TF und fördert die Angiogenese und Zellproliferation (Bergh et al. 2005; Davis et al. 2005). Serin-phosphorylierte (Ser 142 in der DBD) TR dissoziieren von SMRT und assoziieren mit CoA, wie p300 (Davis et al. 2000; Lin et al. 2003). Die  $T_4$  und MAPK-abhängige Acetylierung von TR kann die Translokation von TR in den Zellkern steigern (Lin et al. 2005). Die Effekte auf die TR/TRE-vermittelte Zielgentranskription durch diese Signalwege werden anteilig auch in dem TH-Reportergenassay erfasst, während die Effekte auf andere TF nicht bewertet werden können.

Auch der PI3-K (Phosphatidylinositol 3-Kinase)/Akt-Signalweg kann von  $T_3$  und TR angesprochen werden. Dabei interagieren TR in Abhängigkeit von  $T_3$  mit der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3-K und regulieren Ziele, wie Rac oder mTOR (*mammalian target of rapamycin*), was Zellproliferation, Glucoseaufnahme und Zellvitalität steigert (Cao et al. 2005; Storey et al. 2006). Im kardiovaskulären System reguliert  $T_3$  über den PI3-K/Akt-Signalweg die Phosphorylierung und Aktivierung von eNOS (endotheliale NO (Stickstoffmonoxid)-Synthase) und übt dadurch blutdrucksenkende und neuroprotektive Wirkungen aus (Hiroi et al. 2006). Ein weiteres System, in dem eine  $T_3$ -induzierte Stimulation des PI3-K/Akt-Signalwegs beschritten wird, konnte in alveolären epithelialen Zellen der Lunge aufgeklärt werden. Hier vermittelt die Src-Kinase in Abhängigkeit von  $T_3$  eine Aktivierung des PI3-K/Akt-Signalwegs und infolgedessen auch der alveolären Na/K-ATPase (Bhargava et al. 2007).

Diese TH-Wirkung sowie die Regulation verschiedener Ionenkanäle durch nicht-klassische TH-Effekte (Davis und Davis 2002; Moeller et al. 2006; Davis et al. 2007) können mit den im Rahmen dieser Arbeit aufgebauten TH-Reportergenassay nicht

detektiert werden. Testsysteme für nicht-genomische Effekte von  $T_3$  sind bisher noch nicht gut für ein ED-Screening geeignet. Dies hängt damit zusammen, dass diese nicht-genomischen Effekte zelluläre Ziele ansprechen, die Signaleingänge von vielen unterschiedlichen Quellen bekommen und zelluläre Signalwege und Prozesse beeinflussen, die auch durch eine Vielzahl anderer Stimuli angesprochen werden. Deshalb ist eine Diskriminierung zwischen echtem  $T_3$ -Effekt und Konsequenz eines anderweitigen Reizes nur schwierig eindeutig aufzuzeigen. Eine  $T_3$ -Abhängigkeit der beobachteten Phänomene kann meist nur über Umwege nachgewiesen werden und setzt aufwendige Methoden der Grundlagenforschung voraus.

### 4.3.7 Vorteile des Assays

Ein Vorteil gegenüber vergleichbaren Assays ist der große dynamische Bereich, der bisher noch nicht annähernd von anderen Assays mit TRE-Reportergenen erreicht wurde. Durch die reprimierende Wirkung bei Kotransfektion mit TR in Abwesenheit von Liganden wird in Kombination mit der großen Induzierbarkeit ein hervorragendes Signal-Rausch-Verhältnis erreicht, das die Qualität des Assays hervorhebt. Des Weiteren stellt das verwendete Zellsystem eine solide Grundlage für einen ED-Screeningassay auf  $T_3$ -Effekte dar. Die gute Reproduzierbarkeit sowie das Format des Assays sind weitere Vorteile gegenüber anderen Assays. Bei Pool-Transfektion in einer T150 Zellkulturflasche können leicht sechs 96-Well Platten genutzt werden. Damit kann man beispielsweise Dosis-Wirkungs-Experimente mit je 6 unterschiedlichen Konzentrationen von 11 Testsubstanzen sowohl im Aktivierungsassay als auch im  $T_3$ -Kompetitionsassay und mit jeweils 4 Replikaten für jede Inkubation messen. Man hat dann zusätzlich noch die Möglichkeit neben den obligaten Lösungsmittelkontrollen und  $T_3$ -Standards eine  $T_3$ -Dosis-Wirkungskurve als Qualitätsstandard mit zu messen, alles jeweils auch als Quadruplikat. Üblicherweise werden alle Einzelexperimente dreimal wiederholt, aber bereits mit einem Experiment verfügt man über 4 Replikate für jede Inkubation. Von der Vorbereitung der Zellen für die Transfektion über die Transfektion und die Inkubation mit den Testsubstanzen bis zur Messung benötigt man drei Tage. Eventuell ließe sich noch ein Tag einsparen, wenn man die Zellen direkt bei der Aussaat in die 96-Well Platten in Suspension transfizieren würde. Die Etablierung von stabil transfizierten Reportergenzellen wäre wünschenswert, weil sich dadurch ebenfalls Zeit und die Kosten für die Transfektion sparen ließen. Eine weitere Miniaturisierung unter Nutzung von Automaten ist auch möglich und würde den möglichen Durchsatz weiter erhöhen.

Aufgrund seiner angeführten Eigenschaften stellt dieser  $T_3$ -Reportergenassay bereits in der aktuellen Form eine exzellente Lösung für die Fragestellung der Arbeit dar.



### 4.4 Alternative Assays

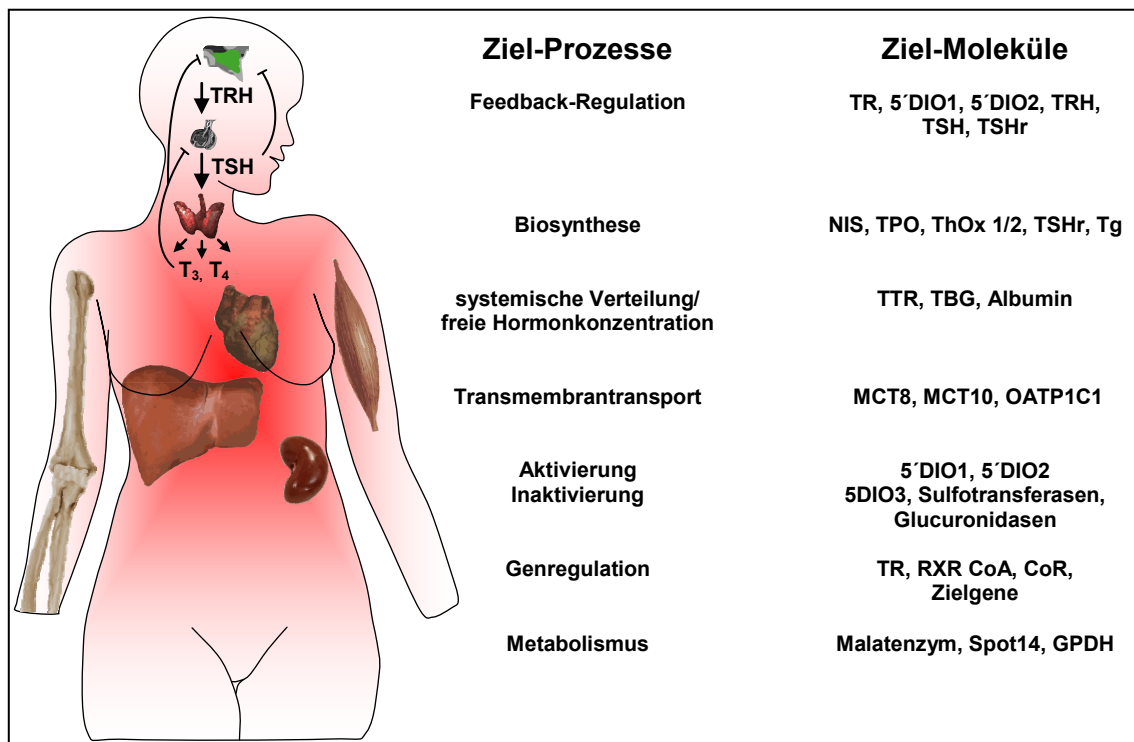
Um Effekte von ED auf die  $T_3$ -vermittelte Genexpression zu analysieren, sind neben Reporteragenassays auch andere *in vitro* Assays einsetzbar. So kann durch Transkript-Analyse mittels quantitativer Realtime-PCR, Northernblotting oder cDNA-Array-Technik der Effekt von ED auf die Zielgenexpression untersucht werden. Einige gute Kandidaten für eine Organ- bzw. Zelltyp-spezifische  $T_3$ -Zielgen-Analyse sind in Kapitel 4.2.5 aufgeführt (z. B. DIO1, Spot14, FGFR1, SERCA). Diese Techniken sind aber weitaus aufwendiger und kostenintensiver als Reporteragenassays.

#### 4.4.1 Alternative *in vitro* Assays

Neben dem Einfluss auf die  $T_3$ -regulierte Genexpression, der mit den bisher beschriebenen Verfahren und dem hier entwickelten Reporteragenassay untersucht werden kann, gibt es im TH-System aber auch noch ein große Anzahl weiterer potenzieller Ziel-Prozesse und -Moleküle für eine endokrine Disruption. In Anlehnung an Abb. 1, die einige generelle Wirkmechanismen von ED in Bezug auf einige Teilaspekte der Hormon-Bioverfügbarkeit, der Hormon-Wirkung und der Feedback-Regulation durch Hormone aufführt, gibt Abb. 36 einen schematischen Überblick über TH-System-spezifische Ziele der ED-Wirkung. Zu den möglichen Ziel-Prozessen von ED-Wirkung gehört die Biosynthese von TH mit Zielmolekülen, wie NIS, TPO, ThOx 1/2, TSHr und Tg; die systemische Verteilung von TH durch Serumbindungsproteine, wie TBG, TTR und Albumin; der Transmembrantransport durch die Zielzellen mithilfe von MCT10, MTC8 und OATP1C1; die Deiodierung von  $T_4$  zum aktiven  $T_3$  durch DIO1 und DIO2; die Inaktivierung von  $T_3$  durch DIO3, Sulfotransferasen und Glucuronidasen sowie die Feedbackregulation mit Zielmolekülen, wie TR, DIO1, DIO2, TSH, TSHr. Assays zur Analyse dieser Knotenpunkte im Regulationsnetz der HPT-Achse stehen zum Teil zur Verfügung, zum Teil müssen sie aber erst noch entwickelt werden (Zoeller et al. 2007a).

Durch *in vitro* Systeme kann ein großer Teil dieser Endpunkte des TH-Systems untersucht werden (Zoeller und Tan 2007). So stehen Iodid-Aufnahme-Assays zur Analyse der ED-Effekte auf NIS zur Verfügung (Radovic et al. 2005). Mit zellulären TH-Aufnahme-Assays ließen sich Interferenzen der Testsubstanzen mit dem zellulären Im- und Export von  $T_4$  und  $T_3$  detektieren (Friesema et al. 1999). TR-Bindungsassays, z. B. mit radioaktivem  $T_3$ , bieten die Möglichkeit, die direkte Interaktion von Testsubstanzen mit TR zu bewerten, können aber nicht zwischen Agonismus und Antagonismus unterscheiden (Furlow et al. 2004). Ob ein ED die Rekrutierung von CoA oder CoR beeinflusst, kann man mit speziellen Mammalian-Two-Hybrid Experimenten untersuchen (Lim et al. 2002).

Einige weitere Assays eignen sich sowohl zur Untersuchung von Proben aus *in vivo* Experimenten als auch zur Analyse von Zellkulturexperimenten. Dazu gehört der TPO-Assay, durch den ED-Wirkungen auf die Organifizierung von Iod durch die TPO untersucht werden können (Schmutzler et al. 2007). Auch Bindungsstudien mit TTR, TBG und Albumin zählen zu diesen Tests (Radovic et al. 2006). Mit Deiodase-Assays können die Einflüsse von ED auf DIO1, DIO2 und DIO3 aus beiden Probenquellen untersucht werden (Schmutzler et al. 2004). Enzymassays für T<sub>3</sub>-regulierte Enzyme, wie Malatenzym und GPDH (Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase), gehören auch in diese Kategorie von Assays. Mit FRET-Experimenten könnte man einen neuen Assay zur Detektion von schnellen ED-Effekten auf CoA- und CoR-Rekrutierung aufbauen. Alle diese Assays sind aber bisher nicht gut für ein Hochdurchsatz-Screening geeignet (Zoeller und Tan 2007).



**Abb. 36: Potenzielle Ziele von ED im Schilddrüsenhormonsystem**

Zu den möglichen Ziel-Prozessen, mit denen ED im TH-System interferieren können, zählen solche, welche die Bioverfügbarkeit von TH beeinflussen (Biosynthese, systemische Verteilung, freie Hormonkonzentration, Transmembrantransport, Aktivierung/Inaktivierung und Exkretion von TH). Weitere zentrale Prozesse des TH-Systems, die durch ED gestört werden können, betreffen die Genregulation durch T<sub>3</sub>. Auch das Feedback-Regulations-System der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse stellt einen potenziellen Wirkungspunkt von ED dar. In der rechten Spalte der Abbildung sind einige wichtige mögliche Zielmoleküle der Prozesse der mittleren Spalte angegeben. Eine Interferenz von ED mit diesen Prozessen und Molekülen kann durch spezifische Assays untersucht werden, um ein detaillierteres Bild einer solchen Wechselwirkung zeichnen zu können. Auch organspezifische Effekte von ED sind möglich. Zur Illustration der Bedeutsamkeit solcher Wechselwirkungen sind einige Zielorgane der T<sub>3</sub>-Wirkung dargestellt (Knochen Leber, Niere, Herz, Skelettmuskel, Hypothalamus, Hypophyse).

### 4.4.2 *In vivo Assays*

Schilddrüsenhormone und Schilddrüsenhormon-regulierte Signalwege kommen in allen Vertebraten und auch in Invertebraten aus der Stammgruppe der Deuterostomier vor (Heyland und Moroz 2005). In allen diesen Gruppen regulieren sie Entwicklung, Stoffwechsel und Homöostase (Tan und Zoeller 2007). So regulieren TH die Metamorphose von Tieren aus der Gruppe der Echinodermata, z. B. des Sanddollars *Leodia sexiesperforata* (Heyland et al. 2004) und von bestimmten Fischen, z. B. der Flunder *Paralichthys olivaceus* (Yamano et al. 1994). Die Metamorphose von Amphibien stellt ein bemerkenswertes Beispiel für die Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die Entwicklung eines Organismus dar (Tata 2006; Kloas und Lutz 2006). Im Falle der Metamorphose von Kaulquappen zu Fröschen bedeutet dies beispielsweise für viele Froscharten, dass sich ein aquatischer Organismus mit Kiemenatmung zu einem terrestrischen Lebewesen mit Lungenatmung wandelt (Kloas 2002). Hierfür bedarf es gut regulierter transkriptioneller Ereignisse, die gezielt Apoptose, Resorption und Remodellierung von Gewebe steuern. Für die Entwicklung von Vögeln sind TH ebenfalls essenziell (Olson et al. 1999; McNabb 2006). Sowohl die Chemie der Schilddrüsenhormone als auch der Proteine, die an ihrer Biosynthese beteiligt sind und die Signalwege des TH-Systems sind zwischen den Vertebraten-Taxa hoch konserviert (Tan und Zoeller 2007). Wegen dieser engen Verwandtschaft von TH-Synthese, -Signalwegen und -Regulation unter den Tiergruppen können ED-Effekte, die in einer Tierart auftreten, in einem gewissen Rahmen auch auf andere Arten, z. B. den Mensch, übertragbar sein (Tan und Zoeller 2007). Aufgrund dieser Gegebenheiten und anderer Eigenschaften, die eine Eignung als Versuchstiere begünstigen (kurze Generationsdauer, günstige Tierhaltung, einfach durchzuführende Assays), bieten sich diese Tierarten für die Entwicklung und Nutzung von Assays zur Analyse bestimmter Endpunkte der TH-Achse im Tiermodell prinzipiell an. Solche Modelle können zwar nicht exklusiv zur Klärung aller Fragen der Risikobewertung von ED für andere Spezies verwendet werden, doch können sie als gute Indikator-Modelle dienen. Weil die Metamorphose von Amphibien stark von einem funktionellen TH-System abhängig ist und im Vergleich zu anderen Modellen, wie dem Zebrafisch, das für TH-Effekte sensitivste System darstellt, ist dieses Modell sehr gut zum ED-Screening geeignet (Kloas 2002; Opitz et al. 2005; Kloas und Lutz 2006; Opitz et al. 2006b). Die im Vergleich zu Nagern einfachen und gut kontrollierbaren Exposition mit ED stellt einen weiteren Vorteil dar (Kloas und Lutz 2006). Besonders der *Xenopus* Metamorphose Assay (XEMA) hat sich für das Screening von ED als sehr wertvoll erwiesen, da man sich hier das gut etablierte Tiermodell *Xenopus laevis* zunutze macht (Opitz et al. 2005; Kloas und Lutz 2006; Opitz et al. 2006a).

Neben diesen speziellen Tiermodellen zur Untersuchung der TH-gesteuerten Metamorphose können auch höhere Vertebraten, z. B. Nager, zur Analyse von ED-Effekten auf das TH-System genutzt werden. Ratten und Mäuse haben als Versuchstiere weite Verbreitung erlangt und es gibt dementsprechend in sehr vielen Instituten und Labors auch eine solide, speziell auf die Haltung von und Arbeit mit diesen Tieren ausgelegte Infrastruktur. Ebenso ist eine Vielzahl an spezifischen analytischen Werkzeugen, wie Antikörpern, Testbestecken zur Hormonbestimmung, molekularbiologischen Hilfsmitteln und Apparaten für physiologische und ethologische Untersuchungen kommerziell verfügbar. Physiologische Parameter der unterschiedlichen Laborstämme von Nagern sind gut charakterisiert. Dazu gehören unter anderem auch Hormonwerte. Die Exposition dieser Tiere mit Testsubstanzen kann auf unterschiedliche Weise erfolgen, die der entsprechenden Fragestellung angepasst werden kann. Sie kann beispielsweise oral über das Trinkwasser oder Futter, durch Injektionen, durch implantierte Pellets bzw. Minipumpen oder transdermal erfolgen. Dies stellt je nach Art der ED-Applikation einen größeren oder kleineren personellen und finanziellen Faktor dar, ermöglicht jedoch auch eine Einflussnahme z. B. auf die möglichen Wege zur Metabolisierung der Stoffe durch den Testorganismus oder auf diurnale Rhythmen bestimmter Stoffwechselvorgänge. In Bezug auf die Analyse des TH-Systems bieten sich alle im jeweiligen Tiermodell vorhandenen Komponenten, speziell die Serumwerte der Hormone, an. Weitere Endpunkte können dann beispielsweise durch schon erwähnten Methoden, wie TPO-Assay oder Deiodase-Assay und viele zusätzliche Assays analysiert werden (Schmutzler et al. 2004; Zoeller et al. 2007b). Mithilfe von histologischen Untersuchungen können Veränderungen von bestimmten Organen, speziell der Schilddrüse, durch ED detektiert werden. Proben aus Tierexperimenten können auch mittels Genexpressionsanalysen und Proteinanalytik ausgewertet werden. Diese Methoden lassen sich zumeist auch auf Tiere aus Metamorphose Assays anwenden (Opitz et al. 2006b; Jagnytsch et al. 2006; Opitz et al. 2006a; Opitz et al. 2006c).

### **4.4.3 Vergleich von *in vitro* und *in vivo* Assays**

Ein großer Vorteil von *in vivo* Assays ist, dass hier ein intakter Organismus Prozesse wie Aufnahme, Verteilung, Metabolismus und Exkretion der Testsubstanzen, steuert. Sofern diese Prozessierung der Substanzen in zwei zu vergleichenden Organismen, wie Versuchstier und Mensch, in gleicher Weise von statten geht, ist somit eine sehr gute Übertragbarkeit der ED-Wirkung gegeben. Dies ist jedoch nicht unbedingt immer der Fall oder es ist oft zu wenig über die Vergleichbarkeit des Metabolismus zweier Organismen bekannt. Da komplette funktionelle Organe im Versuchstier vorhanden

sind, können die Wirkungen von ED auf das gesamte Gefüge eines Organs und seine Funktion erforscht werden. Auch Effekte auf die zirkulierenden Hormone und andere physiologische Wirkungen können nur mit einem *in vivo* Modell untersucht werden.

Eine Aussage über die molekularen Details der ED-Wirkung kann aber nur bedingt oder überhaupt nicht gemacht werden. Zudem sind *in vivo* Assays zeitaufwendig, arbeits- und kostenintensiv und fordern Versuchstiere samt geeigneter Infrastruktur. Untersuchungen einer großen Anzahl unterschiedlicher Testsubstanzen möglichst verschiedener Konzentrationen sind nur sehr aufwendig und langwierig durchzuführen, sodass sie sich *in vivo* Assays nicht für Hochdurchsatz-Screenings eignen. Im Vergleich dazu erlauben *in vitro* Assays die Analyse definierter Endpunkte und molekularer Wirkmechanismen, jedoch spiegeln sie nicht unbedingt die Situation *in vivo* wider. Viele *in vitro* Assays bieten den Vorteil, dass sie sich leichter an Hochdurchsatz-Screenings anpassen lassen. Für einige Fragestellungen stellen zellbasierte Reporterassays einen Kompromiss aus *in vivo* und *in vitro* Assays dar und erlauben ein schnelles paralleles Screening vieler Testsubstanzen. Die Frage nach der Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation kann nicht immer direkt beantwortet werden.

Das endokrine System stellt nur eine, wenn auch essenzielle und sehr komplexe, Komponente der physiologischen Ausstattung eines Organismus dar. Interaktionen mit dem Nerven- und Immunsystem sowie die regulatorischen Beziehungen zu den Organen verstärken zusätzlich die Komplexität des ohnehin schon vielschichtigen Bildes. Deshalb und aus den oben genannten Gründen stellt eine intelligente und ethisch gut durchdachte Kombination aus *in vitro* und *in vivo* Assays die vermutlich sinnvollste Möglichkeit zur Analyse und Bewertung von ED dar. Alle Details von ED-Wirkungen werden wohl auch in näherer Zukunft nicht komplett erfasst werden können.

### 4.5 Screening der Testsubstanzen

In den Analysen dieser Arbeit fielen die Effekte der Testsubstanzen im Vergleich zu  $T_3$ , TH-Analoga und synthetischen TR-Agonisten recht gering aus und traten erst in vergleichsweise hohen Konzentrationen auf. Dies fiel besonders im Aktivierungsassay auf, denn hier waren bei allen betreffenden Substanzen die Effekte mit 1,1-facher bis 2,8-facher Induktion im Vergleich zu den Effekten von  $T_3$  mit 122-facher und dem synthetischen Agonisten GC-1 mit 69-facher Induktion sehr schwach (vgl. Tab. 12 und 13). Selbst einige TH-Metaboliten hatten eine wesentlich stärkere agonistische Wirkung und erreichten Induktionsfaktoren von 47-fach ( $rT_3$ ) bis 64-fach (3,5- $T_2$ ) (Tab. 12). Von größerer Bedeutung scheinen die antagonistischen Effekte mancher

Testsubstanzen zu sein, denn hier wurden teilweise reprimierende Wirkungen, die vergleichbar mit denen des synthetischen Antagonisten NH-3 sind, ausgeübt (Tab. 12, 13). Da antagonistische Effekte der Wirkung von endogenen Hormonen entgegenwirken, z. B. durch eine kompetitive Verdrängung des natürlichen Liganden aus der Rezeptorbindung, agonistische Effekte aber eine hormonmimetische Wirkung haben, ist davon auszugehen, dass sich im intakten Organismus antagonistische Effekte stärker auswirken als agonistische, im Speziellen, wenn letztere so gering ausfallen, wie hier beobachtet. Möglicherweise werden die agonistischen Effekte einiger der analysierten Substanzen durch *in vivo* Assays gar nicht detektiert. Die in Abb. 5 dargestellte Vielfalt der T<sub>3</sub>-Wirkungen, sowie das in Abb. 36 schematisierte große Spektrum von potenziellen ED-Zielmolekülen und -Prozessen im TH-System macht eine Bewertung des Gefahrenpotenzials einer Testsubstanz anhand einer Art von Assay sehr schwierig. Generell ist für eine umfassendere Risikoabschätzung von ED eine Kombination unterschiedlicher Assays zu empfehlen (s. Kapitel 7.4). Weitere Faktoren, wie die ED-Expositions-Situation sowie tatsächlich erreichte ED-Konzentrationen in verschiedenen Organen und Geweben, sollten in eine umfassende Risikobewertung mit einfließen. Dies gestaltet sich zum Teil schwierig, da es für die Testkandidaten keine standardisierten Testsysteme zur Konzentrationsbestimmung gibt. Oft wurden aufwendige Extraktionsprotokolle und Nachweistechiken, wie Massenspektrometrie, zum Nachweis von ED in biologischen Proben etabliert (Vandenberg et al. 2007) und da diese Methoden meist laborspezifische Unterschiede aufweisen, ist eine Vergleichbarkeit von Daten aus unterschiedlichen Labors schwierig. Durch eine potenzielle Kompartimentierung und Anreicherung von ED im Körper, z. B. im Fettgewebe oder in der Muttermilch, werden Aussagen über die tatsächlich erreichten Konzentrationen in bestimmten Organen oder Geweben erschwert, sofern sie nicht explizit bestimmt wurden. Es ist anzunehmen, dass auch die jeweiligen Lebensumstände eines Individuums zu einer Verstärkung der ED-Effekte führen können. Beispielsweise ist Iodmangel global betrachtet noch immer ein wichtiges Thema für die öffentliche Gesundheit, da ca. eine halbe Milliarden Menschen in Iodmangel-Regionen leben, was einen unterschiedlich stark ausgeprägten Hypothyreoidismus der Betroffenen zur Folge hat (Hetzel 2000). In Kombination mit Iodmangel könnten die Effekte von ED potenziert werden und somit stärkere adverse Wirkung, speziell bei der Embryonalentwicklung, zur Folge haben. Auch mit geschlechtsspezifischen Effekten von ED muss gerechnet werden (Maerkel et al. 2007) und dem ist insbesondere bei Tierexperimenten Rechnung zu tragen. Diese Beispiele zeigen, wie komplex sich eine Risikobewertung von ED darstellen kann.

### 4.5.1 Testsubstanzen aus der Gruppe der Nahrungsmittelbestandteile

Durch die Nahrung oder über Nahrungsergänzungsmittel wird täglich eine Vielzahl von Stoffen aufgenommen, die unter Verdacht stehen, als ED zu wirken.

Genistein (GEN) gehört zur Klasse der Isoflavone und ist in einigen Pflanzen aus der Familie der Fabacea, z. B. in Soja (*Glycine max*) oder Klee (*Trifolium pratense*) enthalten. Die größte Quelle für humane Exposition stellen Sojaprodukte dar, die sich in der heutigen Gesellschaft wachsender Beliebtheit erfreuen. GEN ist als Phytoöstrogen bekannt und wird u. a. als Alternative zur Hormon-Ersatz-Therapie beworben (Wuttke et al. 2002), was die Humanexposition zusätzlich erhöht. Im T<sub>3</sub>-Reporter-genassay wirkte GEN als schwacher Agonist bei einer Konzentration ab 1 µM (Abb. 30A, Tabelle 13). Dabei ist unklar, ob es sich um spezifische Effekte handelt. Zwar hatte GEN in Konzentrationen bis 10 µM keinen Einfluss im Zellvitalitätsassay (Abb. 35B), jedoch ist bekannt, dass es auch als Kinaseinhibitor wirkt. So könnten sekundäre Phosphorylierungs-abhängige Prozesse zu dem beobachteten Effekt führen. Die im T<sub>3</sub>-Luziferaseassay wirksame Konzentration von 1 µM wird im Plasma von Sojakonsumenten leicht erreicht. In einer Studie wurden in Kindern nach Tofu-Mahlzeiten GEN-Plasmakonzentrationen von 1 µM +/- 400 nM gemessen (Franke et al. 2006). Besondere Aufmerksamkeit bedürfen die Konzentrationen von 2 bis 7 µM, die bei Säuglingen unter Fütterung mit Sojaformulierungen als Milchersatz auftreten können (Doerge und Sheehan 2002). Da die Milchersatzverabreichung meist über eine längere Periode (ca. die ersten vier postnatalen Monate) erfolgt, sind die Säuglinge während einer kritischen Phase der Entwicklung diesen hohen GEN-Spiegeln ausgesetzt. Die Kleinkinder nehmen während dieser Zeit recht konstante Dosen von 3 bis 11 mg/kg Körpergewicht pro Tag an Isoflavonen auf, von denen Genistein einen Anteil von mindestens 65 % hat (Setchell et al. 1998; Irvine et al. 1998). In diesem Kontext wurde mehrfach über Soja-induzierte Strumenbildung bei Kleinkindern berichtet (Doerge und Sheehan 2002). Inwieweit die agonistischen Effekte auf die T<sub>3</sub>-vermittelte Genexpression in einer solchen Expositionssituation von Bedeutung sind, ist noch unklar und könnte mit transgenen Reportergentieren untersucht werden. Eine weitere bekannte Wirkung von GEN auf das TH-System ist die Blockierung der Tyrosin-Iodierung durch das Enzym TPO, indem GEN als alternatives Substrat dient (Divi et al. 1997). Dabei liegt der IC<sub>50</sub>-Wert bei 1-10 µM, einer Konzentration, die nach den Kenntnissen um die Expositionssituation als physiologisch bedeutsam angesehen werden muss. Auch im Zusammenspiel mit der Veränderung der freien Hormonkonzentration durch GEN, die aus der Verdrängung von T<sub>4</sub> aus der Bindung an TTR mit IC<sub>50</sub>-Wert von 70 nM (Radovic et al. 2006) resultieren kann, scheinen die hier gewonnen Ergebnisse *in vivo* von Bedeutung zu sein.

Resveratrol (RES) ist ein Polyphenol, das z. B. in roten Weintrauben und entsprechenden Folgeprodukten, wie Rotwein, vorkommt. Auch in Erdnüssen ist RES enthalten. Serumspiegel von 1 bis 8  $\mu\text{M}$  führen zu einer Erhöhung des Serum- $\text{T}_3$  in Ratten (Bottner et al. 2006). Außerdem wird RES mit einer kardioprotektiven Wirkung in Verbindung gebracht und entsprechend positiv werden RES-haltige Produkte beworben (Sato et al. 2002). Im  $\text{T}_3$ -Reportergenassay wirkte es in dieser Konzentration sowohl im Aktivierungsassay als auch im  $\text{T}_3$ -Kompetitionsassay leicht agonistisch. In Metabolisierungsstudien mit RES konnte gezeigt werden, dass RES in HepG2 Zellen die Expression der Phase II Enzyme UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 und 2B7 (UGT1A1, UGT2B7) sowie die Sulfotransferase 1E1 (ST1E1) induziert und relativ schnell (10  $\mu\text{M}$  RES innerhalb einer 8-stündigen Inkubation) metabolisiert wird (Walle et al. 2004; Lancon et al. 2007). Falls diese Metabolisierung auch im hier genutzten Zellsystem ähnlich schnell abläuft, könnten Effekte auf die Expression des  $\text{T}_3$ -Reportergens aber dennoch erfasst werden, denn die modifizierte FLuc ist sehr stabil und akkumuliert in den Zellen, sodass ein Integral der Reportergenaktivität über die Inkubationsdauer gemessen wird (Promega). Im Vitalitätsassay hatte RES bei 10  $\mu\text{M}$  eine leicht negative Wirkung auf die Zellvitalität, die allerdings nicht statistisch signifikant war. Da auch andere Arbeitsgruppen bei diesen hohen Konzentrationen einen inhibitorischen Effekt auf die Proliferation von HepG2 publiziert haben (Sternbo et al. 2006), können bei Untersuchungen mit einer RES-Konzentration über 1  $\mu\text{M}$  Nebeneffekte, die auf einer veränderten Zellvitalität beruhen, nicht ganz ausgeschlossen werden. Dann wäre im Reportergenassay aber eher mit einer Erniedrigung der Luziferase-Aktivität zu rechnen und hier war eine schwache Erhöhung zu messen. Dies könnte also ein Hinweis auf eine echte schwache  $\text{T}_3$ -agonistische Wirkung von RES sein. Neue Erkenntnisse um gegensätzliche Effekte von  $\text{T}_3$  und RES auf die Vitalität von Krebszellen, die durch Integrin  $\alpha\text{V}\beta 3$  und den MAPK-Signalweg vermittelt werden (Lin et al. 2007a; Lin et al. 2007b), zeigen weitere Möglichkeiten zur Interferenz von RES mit dem TH-System auf, die mit diesem Reportergenassay nicht erfasst werden können. Es liegen auch Daten zur RES-Resorption im Menschen vor. Demzufolge wird RES nach oraler Gabe von Testpersonen zwar gut aufgenommen (Absorption von ca. 70 %) aber die Bioverfügbarkeit von nicht-metabolisierten RES ist nahe Null, denn es wird schon 15 min nach Aufnahme ins Blut glucuronidiert und sulfatiert (Walle et al. 2004; Saiko et al. 2007). Eine Stunde nach Gabe einer oralen Dosis von 25 mg  $^{14}\text{C}$ -RES wurde in sechs Testpersonen eine Serum-Konzentration aller RES-Metaboliten von ca. 2  $\mu\text{M}$  gemessen und die Plasma-Halbwertszeit aller Metaboliten beträgt durchschnittlich 9 h (Walle et al. 2004). Eine Akkumulation von RES in epithelialen Zellen des Verdauungstrakts vor der Metabolisierung wird jedoch



von diesen Autoren postuliert und eine biologische Wirkung der Metaboliten ist möglich. Da RES unter normalen Umständen ausschließlich oral aufgenommen und dann sehr schnell metabolisiert wird, ist die Relevanz der hier im Screening beobachteten Effekte auf das TH-System *in vivo* als recht gering einzustufen, speziell, weil die ausgeübten agonistischen Effekte schwach im Vergleich zu endogenen TH und TH-Metaboliten ausfielen. Die Frage, ob der leichte TR-Agonismus von RES selbst oder von bestimmten Metaboliten herrührt, könnte eine Einschätzung der Bedeutung für die menschliche Gesundheit vereinfachen.

Silymarin (SIL) ist eine standardisierte Mischung aus den Flavonolignan (Silybin A und B, Isosilybin A und B, Silychristin, Isosilychristin und Silydianin) und dem Isoflavonoid Taxifolin (Kroll et al. 2007) und es wird aus dem Extrakt der Mariendistel (*Silybum marianum*) gewonnen. Es findet als hepatoprotektives Mittel und Antioxidant weitverbreitete Verwendung in Form von Nahrungsergänzungsmitteln, die mit einem jährlichen Umsatz von 180 Millionen US Dollar allein in Deutschland konsumiert werden (Pradhan und Girish 2006). Die humane Expositionslage rechtfertigt also eine Untersuchung der Substanz. Die Flavonolignane aus SIL werden nach oraler Aufnahme schnell metabolisiert, sodass vorwiegend ihre glucuronidierte Formen im humanen Blut vorliegen (Wen et al. 2007). Außerdem werden die freien Flavonolignane schon nach 1-3 h eliminiert und die konjugierten nach 3 bis 8 h. Im T<sub>3</sub>-Reporterassay war SIL ein schwacher Agonist und es hatte keine negativen Effekte auf die Vitalität von HepG2 Zellen. Eine Wirkung als effektiver Disruptor des TH-System ist aufgrund der Datenlage als unwahrscheinlich einzuschätzen.

Xanthohumol (XN) ist ein Prenylflavonoid aus Hopfen und kommt daher auch in Bier in Konzentrationen von 6 nM bis 3,4 µM vor (Gerhäuser 2005). Eine weitere, aber bezüglich ihres Handelsvolumens nicht sehr bedeutsame Kontaminationsquelle von XN stellen Hopfenpräparate dar, die aufgrund des ebenfalls in Hopfen enthaltenen Phytoöstrogens 8-Prenylnaringenin unter anderem als natürliche Mittel zur Brustvergrößerung vermarktet werden (Stevens und Page 2004). Im Reporterassay hatte XN bei einer Konzentration von 10 µM eine Wirkung als gemischter Agonist/Antagonist. Das ist ein ähnlicher Effekt, wie er auch von NH-3 ausgeübt wird, und weist auf eine T<sub>3</sub>-kompetitive TR-Bindung von XN hin. Allerdings ist der reprimierende Effekt von XN nicht so stark ausgeprägt und tritt mit einer höheren LOEC von 10 µM im Vergleich zu 50 nM auf (Tabelle 12, 13). Eine generelle toxische Wirkung von XN konnte bei dieser Konzentration im Vitalitätsassay nicht nachgewiesen werden. Über die Beeinflussung des TH-Systems durch XN ist des Weiteren bekannt,

dass es die Iodaufnahme von FRTL-5 Zellen in einer Konzentration von 1 nM stimuliert (Radovic et al. 2005). Zudem konkurriert XN mit  $T_4$  um die Bindung an TTR mit einem  $IC_{50}$ -Wert von 1  $\mu$ M (Radovic B, persönliche Kommunikation). In Kombination mit den antagonistischen Effekten auf die  $T_3$ -regulierte Transaktivierung empfiehlt sich eine weitere Analyse der XN-Wirkungen auf das TH-System.

### **4.5.2 Testsubstanzen aus der Gruppe der UV-Absorbern aus Kosmetika**

UV-Filter, die in Sonnenschutzmitteln oder aber auch allgemein in Kosmetika und Kunststoffartikeln zum Produktschutz verwendet werden, stellen eine alltägliche Expositionsquelle dar. Zudem ist in den letzten Jahren das Bewusstsein für die Risiken von UV-Strahlung, wie Hautschädigung oder Hautkrebs, gestiegen. Dies führte zu einer vermehrten Nutzung von Sonnenschutzmitteln. Der Anteil von UVA- (315-400 nm) und UVB-Filtern (280-315 nm) in solchen Produkten ist relativ hoch und kann bis zu 10 % (w/w) betragen (Schlumpf et al. 2001). Da diese organischen Substanzen stark lipophil sind, akkumulieren sie nachweislich in der Umwelt (Poiger et al. 2004) und so kann es neben der transdermalen Absorption (Jiang et al. 1999; Janjua et al. 2004) auch durch die Nahrungskette zur Human-Exposition kommen. Im humanen Körperfett können diese Stoffe ebenfalls akkumulieren (Gonzalez et al. 2006).

Viele alltägliche Kosmetika enthalten nicht unerhebliche Mengen von Benzophenon 2 (BP2) und stellen daher durch dermale Applikation eine stetige Expositionsquelle dieses Stoffes dar. BP2 hatte im Reporterassay auf beide TR leicht agonistische Effekte bei Konzentrationen ab 1  $\mu$ M. Von dem strukturell nahe verwandten BP3 ist bekannt, dass es die menschliche Haut penetrieren kann und dabei Plasmakonzentrationen von 1,3  $\mu$ M erreicht (Janjua et al. 2004). Deshalb erscheint die im Reporterassay wirksame Konzentration von 1  $\mu$ M auch für BP2 als humanrelevante Dosis, auch im Hinblick auf die zu erwartende Bioakkumulation der Substanz in der Zukunft. Bei diesem 1000-fachen molaren Überschuss von BP2 gegenüber  $T_3$  hätte BP2 also eine schwache ektope Induktion der  $T_3$ -Zielgene zur Folge, sofern das endokrine System keine greifenden Kompensationsmechanismen bietet. Untersuchungen dazu können nur im intakten Organismus durchgeführt werden. Eine weitere Bedeutung für eine Störung des TH-Systems könnte BP2 durch seine Eigenschaft als potenter Inhibitor der TPO und zukommen (Schmutzler et al. 2007). Zudem führt BP2 zur Reduktion der  $T_4$ -Werte und einem Anstieg von TSH im Serum von behandelten Ratten (Schmutzler et al. 2007).

Benzophenon 3 (BP3) wird als Breitband-UV-Filter in Konzentrationen bis 10 % (w/w) alleine oder in Kombination mit anderen UV-Filtern in Sonnenschutzmitteln eingesetzt

(Janjua et al. 2007). Außerdem wird BP3 zur Photoprotektion lichtempfindlicher Inhaltsstoffe auch in anderen Kosmetika in Konzentrationen bis 0,5% (w/w) verwendet. BP3 induzierte in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  die  $\text{T}_3$ -Reporterogenaktivität schwach (Tabelle 13). Dies ist eine BP3-Konzentration, die offenbar zur tatsächlichen Situation im menschlichen Körper nach intensiver Verwendung von Sonnenschutzmitteln in Bezug steht. Denn eine bisher nicht reproduzierte Studie zeigte, dass BP3 die menschliche Haut penetrieren kann und dabei Plasmakonzentrationen von 300 ng/mL (1,3  $\mu\text{M}$ ) erreichen kann (Janjua et al. 2004). Ob die schwache TR-agonistische Wirkung bei 1  $\mu\text{M}$  im Reporterogenassay jedoch einen Einfluss im Organismus hat, ist unklar. Zumindest ergab nachfolgende Analyse der Schilddrüsenparameter TSH,  $\text{T}_4$ ,  $\text{T}_3$  und TBG zu der BP3-Studie von Janjua et al. keine Effekte auf die Homöostase der Schilddrüsenwerte im Blut (Janjua et al. 2007). In einer weiteren Arbeit wurde berichtet, dass Testpersonen auch 5 Tage nach der letzten dermalen Applikation noch BP3 über den Harn ausschieden, was auf eine erhebliche Akkumulation im Körper hinweist (Gonzalez et al. 2006). Eine maximale Konzentration von 60 nM wird in einer weiteren Publikation angegeben (Wolff et al. 2007). In einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  beeinflusste BP3 die Zellvitalität negativ. Um generelle toxische Nebeneffekte auszuschließen, sollte deshalb in Tierexperimenten zur Untersuchung des TH-disruptierenden Potenzials von BP3 zunächst in toxikologischen Analysen die maximale, nicht toxische Konzentration bestimmt werden. Die Daten des ED-Screenings weisen nicht auf eine besonders ausgeprägte Interferenz mit dem TH-System hin, doch die Expositions-lage macht BP3 zu einem interessanten Kandidaten für *in vivo* Untersuchungen, auch für andere Hormonachsen.

4-Methylbenzyliden Campher (4MBC) wird in einer Maximalkonzentration von 4 bis 6 % (w/w) als UV-Absorber in Kosmetika, wie Sonnenschutzmittel, Deodorants und Shampoos, verwendet (Janjua et al. 2007). Östrogene Effekte konnten sowohl in Zellkultur als auch durch *in vivo* Assays nachgewiesen werden (Schlumpf et al. 2001; Schlumpf et al. 2004b). 4MBC wirkte im Reporterogenassay in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  als gemischter Agonist/Antagonist. Damit hatte 4MBC eine Wirkung, die dem Referenzantagonist NH-3 ähnlich war, jedoch erst bei höheren Konzentrationen und nicht so stark ausgeprägt auftrat. Ob es sich dabei um eine kompetitive Bindung an TR handelt, könnte durch TR-Bindungsstudien *in vitro* untersucht werden. Ab der Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  war 4MBC schwach aktivierend im Aktivierungsassay, aber der antagonistische Effekt scheint bedeutsamer, wenn man sie mit dem Effekt von NH-3 vergleicht. Eine transdermale Aufnahme von 4MBC nach äußerlicher Applikation wurde in einer Studie mit 32 freiwilligen Versuchspersonen nachgewiesen. Dabei

wurden Plasmakonzentrationen von 20 ng/mL (80 nM) erreicht (Janjua et al. 2004). Bei diesen Wirkspiegeln konnte keine Beeinflussung der Schilddrüsen-Achse nachgewiesen werden (Janjua et al. 2007). In einer weiteren Studie wurde eine Maximalkonzentration von 200 nM im Plasma durch dermale Applikation erreicht (Schauer et al. 2006). Diese Studie zeigte auch, dass 4MBC metabolisiert und ausgeschieden wird, was die Plasmaspiegel relativ schnell wieder senkt. Bei den in diesen Studien ermittelten Konzentrationen von 80 bis 200 nM 4MBC zeigten sich noch keine Effekte im T<sub>3</sub>-Reporterassay. Jedoch liegen diese Konzentrationen nah an der minimalen effektiven Dosis von 1 µM (Tab 13). Deshalb ist es durchaus möglich, dass unter bestimmten Umständen die hier wirksame Konzentration von 4MBC erreicht wird. Tritt dieser Fall ein, so scheint besonders der antagonistische Effekt von 4MBC mit einer um 50 % reprimierten Reporteraktivität von Bedeutung zu sein. Eine Veröffentlichung zur Untersuchung der Einflüsse von prä- und postnataler Exposition von Ratten mit 4MBC durch das Futter berichtet von geschlechtsspezifischen Wirkungen auf das TH-System (Maerkel et al. 2007). Hier wurde bei beiden Geschlechtern eine signifikante Erhöhung des Schilddrüsengewichts nach täglicher 4MBC-Verabreichung von 24 bzw. 47 mg/kg festgestellt. In Weibchen wurde unter diesen Bedingungen auch eine Erhöhung der T<sub>3</sub>-Konzentration im Serum gemessen. Bei der hohen Verabreichungsdosis waren in Weibchen die Serum-TSH-Konzentrationen ebenfalls höher als in Kontroll-Tieren. Außerdem induzierte 4MBC die Expression des Koaktivators SRC-1 im *Nucleus ventromedialis hypothalami* und im *Nucleus preopticus medialis* von weiblichen Tieren. Diese Studie zeigt, dass bei Tierversuchen auch mögliche Geschlechtsunterschiede der ED-Wirkung bei der Untersuchung von ED berücksichtigt werden müssen. Außerdem gibt sie ein Beispiel für die Beeinflussung der CoA-Verfügbarkeit durch ED. Die Analyse von 4MBC in Tierexperimenten könnte zur Klärung der Situation im intakten Organismus beitragen, die Einflüsse auf weitere Parameter des TH-Systems beleuchten und eine Extrapolation bezüglich der Gefährdung des Menschen ermöglichen.

Octylmethoxycinnamat (OMC) wird als UV-Absorber in Sonnencremes verwendet. Dabei wird es in Konzentrationen von bis zu 10 % (w/w) der Gesamtmasse eingesetzt (Janjua et al. 2007). Nach dermalen Applikation wurden in freiwilligen Versuchspersonen Plasmawerte von 20 ng/mL (70 nM) gemessen (Janjua et al. 2004). Auch OMC zeigte keine direkten Effekte auf die zirkulierenden Schilddrüsenparameter im Serum (Janjua et al. 2007). Im T<sub>3</sub>-Reporterassay hatte OMC schwache agonistische Effekte bei einer Konzentration von 1 µM. Angesichts dieser mild ausgeprägten Aktivierung durch OMC ist es als wenig potenter Disruptor der T<sub>3</sub>-

vermittelten Transaktivierung zu bewerten. Allerdings hat OMC Effekte auf andere Endpunkte des TH-Systems, die auf eine Dysregulation des normalen Feedbacksystems hinweisen. Denn die Behandlung von Mäusen mit OMC führt zur Senkung der Serumspiegel von TSH,  $T_4$  und  $T_3$ . Es induziert die Expression des TSHr in der Schilddrüse und reduziert die hepatische DIO1-Aktivität (Klammer et al. 2007). Um die Mechanismen, die dieser atypischen Situation der Feedbackregulation zugrunde liegen zu analysieren, würden sich verschiedene *in vitro* Assays eignen, die für unterschiedliche Endpunkte des TH-Systems spezifisch sind (s. Kapitel 7.4.3). Außerdem könnten  $T_3$ -Reportergermäuse, die auf dem hier konstruierten Reportergermplasmid aufbauen, zur Untersuchung der OMC-Effekte auf die  $T_3$ -Zielgenexpression *in vivo* verwendet werden. Eventuell werden in bestimmten Geweben durch Kompartimentierung und Akkumulation Konzentrationen erreicht, in denen OMC eine effektive Wirkung auf die  $T_3$ -Zielgenexpression ausübt. Angesichts der relativ hohen erreichten Plasmakonzentration ist dies nicht auszuschließen.

### 4.5.3 Screening von Pestiziden

Pestizide, speziell Herbizide und Fungizide werden in großen Mengen in der Landwirtschaft eingesetzt und einige akkumulieren aufgrund ihrer Lipophilie und chemischen Stabilität in der Umwelt und im Fettgewebe.

Acetochlor (ACETO) ist ein weitverbreitetes Herbizid, das als persistierende organische Verunreinigung (*persistent organic pollutant*, POP) in Oberflächengewässern von amerikanischen Flüssen in Konzentrationen von 2,7 bis 10 nM nachgewiesen wurde (Scribner et al. 2000). Effekte auf das TH-System sind aus Amphibien bekannt. ACETO beschleunigt die Schilddrüsenhormon-abhängige Metamorphose von Amphibien (Ranidae und Pipidae) in einer Konzentration von 10 nM (Cheek et al. 1999; Crump et al. 2002). Auch die Expression TH-abhängiger Gene, wie dem TR $\beta$ -Gen in Raniden, wird durch ACETO induziert (Helbing et al. 2006). In Urinproben von Kindern, deren Eltern Farm-Arbeiter sind, wurde eine durchschnittliche Konzentration von 260 pM festgestellt (Arcury et al. 2007). Im  $T_3$ -Reportergergenassay wirkte ACETO als schwacher Antagonist in einer Konzentration von 10  $\mu$ M. Die Effekte wurden nicht durch eine Verminderung der Zellvitalität verursacht. Im Vergleich zu den agonistischen Effekten in Amphibien tritt der im  $T_3$ -Reportergergenassay beobachtete Antagonismus in einer Konzentration auf, die um einen Faktor von 1000 höher ist (Cheek et al. 1999; Crump et al. 2002). Untersuchungen in weiteren Assays sind nötig, um Aussagen über die Bedeutsamkeit dieses Effekts treffen zu können. Jedoch ist ein Gefahrenpotenzial von ACETO für die Umwelt

aufgrund der publizierten Gewässerkonzentrationen und Effekte auf die Amphibienmetamorphose gegeben.

Linuron (LIN) ist ein Herbizid, das unter anderem in Mais-, Soja-, Wein- und Kartoffelanbau verwendet wird, auch z. B. in Karotten nachgewiesen werden kann (Contieri et al. 2007) und für seine antiandrogene Wirkung bekannt ist (Lambright et al. 2000; Gray et al. 2001). LIN hatte schwache agonistische Wirkung im T<sub>3</sub>-Reporterassay mit einer LOEC von 1 µM.

Ein weiteres Herbizid, Nitrofen (NIT), hat strukturelle Ähnlichkeit mit T<sub>3</sub> und übt eine teratogene Wirkung vermutlich über Veränderung des maternalen TH-Status aus (Manson et al. 1984; Manson 1986). NIT vermindert *in vitro* die Bindung von T<sub>3</sub> an TR durch einen nicht-kompetitiven Mechanismus und verdrängt T<sub>4</sub>-kompetitiv aus der Bindung an TBG (Brandsma et al. 1994; Manson 1986). Im ED-Screening dieser Arbeit hatte NIT jedoch keinen Effekt.

Auch das in Obstplantagen verwendete Fungizid Procymidon (PRO) wirkte im ED-Screening als schwacher TR-Agonist in einer Konzentration von 10 µM. Durch die Verarbeitung von Obst, besonders Pfirsichen, gelangt PRO auch in Kleinkindnahrung. Das Schälen der Früchte stellt die effizienteste Methode zur Reduktion einer Kontamination mit PRO dar (Balinova et al. 2006). Eine Bedeutung der schwachen agonistischen Effekte dieser beiden Substanzen ist als gering einzuschätzen. Eine bessere Datenlage über die Humanexposition würde eine Bewertung der Effekte erleichtern.

#### **4.5.4 Screening von Industriechemikalien**

Bisphenol A (BPA; 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propan) wird als Monomer zur Produktion von Plastikpolymeren, besonders von Polycarbonaten eingesetzt (Krishnan et al. 1993; Kang et al. 2006). Es ist auch Bestandteil von Epoxyharzen von Verbundmaterialien, z. B. in der Dentalmedizin (Olea et al. 1996). Eine Hauptkontaminationsquelle stellt die innere Beschichtung von Nahrungsmitteldosen dar (Brotons et al. 1995). Des Weiteren kommt BPA in wiederverwendbaren Nahrungs- und Getränkeverpackungen, CDs, DVDs, Farben, Lacken, Klebstoffen, Elektrogeräten, Wasserversorgungsrohren etc. vor und wird als Weichmacher und Fungizid verwendet (Zoeller 2007). Pro Jahr werden ca. 800.000 Tonnen in der EU produziert, im Jahr 1993 waren es 640.000 Tonnen in den USA (McLachlan 2001) und gegenwärtig ist die Produktionsmenge der USA auf 800.000 Tonnen jährlich gestiegen (Zoeller 2007). Zurzeit werden somit weltweit

mehrere Mio. Tonnen an BPA jährlich hergestellt und in Verkehr gebracht (Nagel et al. 1999; vom Saal et al. 2007).

Im Kompetitionsassay hatte BPA in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  antagonistische Effekte auf die  $\text{T}_3$ -vermittelte Genexpression, wie schon durch Moriyama und Mitarbeiter beschrieben (Moriyama et al. 2002). Jedoch war auch eine schwache induktive Wirkung im Aktivierungsassay zu verzeichnen, sodass BPA ein ähnliches Wirkungsprofil wie NH-3 zeigte, die Effekte aber erst bei höheren Konzentrationen auftraten. Eine Wirkung auf die Zellvitalität konnte bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  BPA nicht festgestellt werden und dies deutet auf eine spezifische Wirkung hin. In Anbetracht der Massenproduktion von BPA besteht Sorge bezüglich eines Gesundheitsrisikos durch BPA. Die in humanen Proben festgestellten BPA-Konzentrationen (Vandenberg et al. 2007) bekräftigen diese Bedenken, denn durch Bioakkumulation könnten sich die BPA-Konzentrationen noch erhöhen. Die BPA-Konzentration in humanen Blut und Gewebeproben unterschiedlicher Länder ist höher als die in Versuchstieren, die nach dem Protokoll der US-EPA behandelt wurden (vom Saal et al. 2007). Die tägliche Aufnahme wird derzeit auf mehr als  $1\mu\text{g/kg/d}$  geschätzt und wird vor allem durch Verwendung von Dosenkonserven verursacht (Kang et al. 2006). In humanen Serumproben wurde eine durchschnittliche BPA-Konzentration von 0,32 ng/mL (1,4 nM) (Inoue et al. 2000) bis 3,1 ng/mL (14 nM) (Schönfelder et al. 2002b) und in Milchproben von 23 stillenden Frauen von  $0,61 \pm 0,20$  ng/mL (2,7 nM) nachgewiesen (Sun et al. 2004). Einzelne Serumproben von schwangeren Frauen enthielten sogar eine BPA-Konzentration von 18,9 ng/mL (80 nM) (Schönfelder et al. 2002b). Bei der Untersuchung der Urinproben von ca. 400 US-Bürgern wurden in 95 % der Proben eine BPA-Konzentration von  $\geq 0,1 \mu\text{g/L}$  (4,4 pM) gemessen (Calafat et al. 2005). Diese Daten weisen auf eine kontinuierliche und anhand der steigenden Produktion auch zunehmende Humanexposition von BPA hin.

In der Literatur gibt es zum Teil widersprüchliche Publikationen (Wetherill et al. 2007). Einige weisen auf  $\text{T}_3$ -agonistische Wirkungen von BPA hin (Ghisari und Bonefeld-Jorgensen 2005), während andere antagonistische Effekte zeigen (Moriyama et al. 2002; Iwamuro et al. 2003). Auch die hier vorliegenden Untersuchungen unterstützen das Konzept des TR-Antagonisten BPA. Durch *in vitro* Studien wurde nachgewiesen, dass BPA mit  $\text{T}_3$  um die Bindung an das Transportprotein Transthyretin (TTR) mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von 1,67  $\mu\text{M}$  konkurriert (Kudo et al. 2006). BPA inhibiert ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  signifikant die  $\text{T}_3$ -vermittelte Genexpression, indem es  $\text{T}_3$  vom TR verdrängt und CoR zu rekrutieren vermag (Moriyama et al. 2002). Auch die hier im ED-Screening gewonnenen Ergebnisse deuten auf eine  $\text{T}_3$ -kompetitive Bindung von TR hin. Die komplexe Wirkung von BPA auf das TH-System macht weitere

Untersuchungen mit unterschiedlichen Assays zur Entwicklung eines Wirkungsmodells von BPA in diesem Hormonsystem nötig.

Dibutylphthalat (DBP) ist ein Weichmacher, der in vielen Nahrungsmittelverpackungen Verwendung findet und antiandrogene Eigenschaften aufweist (Seidlova-Wuttke et al. 2005). DBP war im T<sub>3</sub>-Reporteragenassay schwach agonistisch in einer Konzentration von 1 µM. Im Vitalitätsassay waren bis zu einer Konzentration von 10 µM keine Effekte zu detektieren. Wie auch für die meisten anderen schwach agonistischen ED ist von dem Effekt auf die T<sub>3</sub>-medierte Transaktivierung keine ausgeprägte Wirkung im intakten Organismus zu erwarten.

Das Alkylphenol 4-Nonylphenol (4NP) wird für die Produktion von Detergenzien, Plastik, Tensiden, Emulgatoren, Fungiziden und als Weichmacher eingesetzt. 4NP ist Umwelt-persistent und wirkt östrogen (White et al. 1994). 4NP wirkte im T<sub>3</sub>-Reporteragenassay als gemischter Agonist/Antagonist in einer Konzentration von 1 µM. Agonistische Wirkung hatte 4NP bereits ab 100 nM (Tab. 13). Ein Effekt auf die Zellvitalität trat bei dieser Konzentration noch nicht auf, erst bei 10 µM war eine verminderte Vitalität der HepG2 Zellen zu verzeichnen. Da in Muttermilch von gesunden stillenden Frauen eine Konzentration von bis zu 1,4 ng/g (ca. 6 nM) 4NP nachgewiesen wurde (Otaka et al. 2003), könnte 4NP bei Akkumulation oder Kompartimentierung im Säugling eventuell adverse Effekte haben. Außerdem wurden in einer Studie zur Bestimmung von 4NP im Urin in 51 % der Proben von 394 erwachsenen US-Bürgern 4NP-Konzentrationen von über 0,1 µg/L (ca. 5 pM) nachgewiesen (Calafat et al. 2005), was auf eine generelle Exposition mit 4NP hinweist. In Taiwan beträgt die tägliche Aufnahme von 4NP 28,04 bis 31,4 µg/d und die Hauptquelle für die 4NP-Aufnahme stellt Reis dar (Lu et al. 2007). Besonders hohe Konzentrationen sind dieser Veröffentlichung zu Folge in Austern und Lachs enthalten. Die Analyse von vier Fließgewässern in Hessen ergab, dass während des Untersuchungszeitraums von 2003 bis 2005 die Kontamination mit 4NP reduziert wurde (Quednow und Puttmann 2007). Die Autoren führen dies auf die Durchsetzung der europäischen Direktive 2003/53/EG zurück, die den Verkauf und die Nutzung von Nonylphenol beschränkt. Die maximale Konzentration während der Probennahme war 420 ng/L (1,9 nM). Wirkungen auf das TH-System sind bekannt, z. B. wirkt 4NP in *in vitro* Assays zur Messung der Aktivität der Thyreoperoxidase (TPO) mit einem IC<sub>50</sub>-Wert von 57 µM inhibierend (Schmutzler et al. 2004). In einer 28-Tage-Studie mit Ratten und täglicher oraler Verabreichung erhöhte eine Dosis von 50 mg/kg die Schilddrüsengewichte in männlichen Ratten signifikant (Woo et al. 2006), jedoch traten



dann auch toxische Effekte, wie eine hepatorenale Toxizität, auf (Woo et al. 2007). Auch der adverse Effekt auf die Zellvitalität (Abb. 35) deutet auf eine toxische Wirkung von 4NP hin. Diese Hinweise müssen bei Tierexperimenten beachtet werden, um spezifische Effekte auf das TH-System untersuchen zu können. Aber besonders der antagonistische Effekt gibt Anlass für weitere Untersuchungen.

Flammschutzmittel stellen in der heutigen Gesellschaft eine wichtige Substanzklasse dar, da sie die Folgen von Feuer reduzieren und so zur Rettung von Leben beitragen können. Jedoch sind sie in der Nahrungskette nachweisbar und es konnte ein weites Spektrum toxischer Effekte von Flammschutzmitteln in Labortieren nachgewiesen werden (Kuriyama et al. 2005). Bei 3,3',5,5'-Tetrabromobisphenol A (TBBPA), einem halogenierten Derivat von BPA, handelt sich um ein Flammschutzmittel mit einem der höchsten Produktionsvolumina weltweit (60.000 Tonnen/Jahr) (Zoeller 2005). Verwendet wird TBBPA in großem Umfang in Elektrogeräten unterschiedlicher Art (TV, PC, Kopiermaschinen, Displays, Laserdruckern) und synthetischen Textilien, die z. B. in Teppichen und Polstermöbel verarbeitet werden (Kitamura et al. 2002). TBBPA ist sehr hydrophob und akkumuliert daher im Körperfett. So wurden in humanen Plasma-Lipiden TBBPA-Konzentrationen bis zu 200 pg/g Plasma (ca. 400 pM) detektiert (Thomsen et al. 2001). Im Fettgewebe aus humanen Proben wurden maximale TBBPA-Konzentrationen von 464 pg/g Lipid nachgewiesen (Johnson-Restrepo et al. 2007). Strukturell ähnelt TBBPA dem Hormon  $T_4$  und daher wurde ein Einfluss von TBBPA auf verschiedene Komponenten des TH-Systems erwartet. Tatsächlich konkurriert TBBPA in TTR-Bindungsassays schon in geringen Konzentrationen ( $IC_{50} = 7,7$  nM) mit  $T_4$  um die Bindung von humanen TTR (Meerts et al. 2000) und mit  $T_3$  um die Bindung an die Liganden-Bindungs-Domäne von *Xenopus* TTR ( $IC_{50} = 3,07$  nM) (Kudo et al. 2006). Auch in einem *in vivo* Test zur  $T_4$ -induzierten Metamorphose von *Rana rugosa* wurde eine antithyreoidale Wirkung von TBBPA und eine Konkurrenz um TR-Bindung mit  $T_3$  ( $IC_{50} = 3,5$   $\mu$ M) nachgewiesen. Auf den Frosch *Pseudacris regilla* wirkte TBBPA  $T_3$ -agonistisch, indem 10 nM TBBPA die Expression von TH-abhängigen Zielgenen induzierte und die TH-abhängige Metamorphose förderte (Veldhoen et al. 2006). Im *Xenopus* Metamorphose Assay (XEMA) wirkte TBBPA in einer Konzentration von 500  $\mu$ g/L (ca. 900 nM) inhibitorisch auf die Larvalentwicklung von *Xenopus laevis* (Jagnytsch et al. 2006). Bei Kurzzeit-Exposition (24 bis 72 h) wirkte TBBPA ab einer Konzentration von 100  $\mu$ g/L dosisabhängig antagonistisch auf die  $T_3$ -induzierte Expression der Gene von TR $\beta$  und bZIP (basic region leucine zipper transcription factor) und hatte bei Einzelexposition mit 500  $\mu$ g/L auch agonistische Effekte (Jagnytsch et al. 2006). In  $T_3$ -Reporterergenassays mit CHO-K1-Zellen wurden ab einer

TBBPA-Konzentration von ca. 10  $\mu\text{M}$  schwache agonistische Effekte beobachtet und in  $\text{T}_3$ -Kompetitionsexperimenten ein recht stark ausgeprägter Antagonismus (Kitamura et al. 2005). Eine weitere Veröffentlichung zur Wirkung von TBBPA in  $\text{T}_3$ -Reporterassays konnte diese Ergebnisse in einer PC12-Reporterzelllinie bestätigen (Jugan et al. 2007). Auch hier übte TBBPA ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  in Abwesenheit von  $\text{T}_3$  einen schwachen agonistischen und in Anwesenheit von 0,3 nM  $\text{T}_3$  einen starken antagonistischen Einfluss aus. Im  $\text{T}_3$ -Reporterassay dieser Arbeit war TBBPA ein gemischter Agonist/Antagonist bei Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ . Der antagonistische Effekt trat ab einer LOEC von 1  $\mu\text{M}$  auf und war bei 10  $\mu\text{M}$  sehr stark ausgeprägt, ähnlich stark, wie bei NH-3 allerdings trat er erst bei einer höheren Konzentration auf. Das Ergebnis, dass im Vitalitätsassay keine Effekte bis 10  $\mu\text{M}$  auftraten, schließt einen Einfluss durch Verringerung der Zellzahl aus. Eine aktuelle Publikation zeigt aber negative Effekte auf die Vitalität anderer Zelllinien mit einem  $\text{IC}_{50}$ -Wert von >50  $\mu\text{M}$  und dosisabhängige Effekte auf verschiedene Signalwege (Strack et al. 2007).

### 4.5.5 F21388

F21388 ist ein synthetisches Flavonoid, das ursprünglich als  $\text{T}_4$ -Analog entwickelt wurde (Köhrle et al. 1988). Es sind zahlreiche Wirkungen auf das TH-System bekannt. F21388 verdrängt  $\text{T}_4$  aus der Bindung an TTR und inhibiert DIO1 (Köhrle et al. 1988; Köhrle et al. 1989). Die Iodaufnahme und die Organifizierung von Iod wird durch eine Repression der NIS-Expression, durch eine Steigerung des Effluxes, vermutlich mediert durch Pendrin und eine Hemmung der TPO inhibiert (Schröder-van der Elst JP et al. 2003; Schröder-van der Elst JP et al. 2004; Schmutzler et al. 2007).

F21388 wirkte in Konzentrationen über 3  $\mu\text{M}$  statistisch signifikant als potenter gemischter TR-Agonist/Antagonist im  $\text{T}_3$ -Reporterassay. Der berechnete  $\text{IC}_{50}$ -Wert lag bei 3,1  $\mu\text{M}$ . Agonistische Effekte hatte F21388 schon bei einer Konzentration von 100 nM. Dies deutet auf eine  $\text{T}_3$ -kompetitive Bindung des TR durch F21388 hin. Seine vielfältigen Wirkungen auf das TH-System machen F21388 zu einem interessanten Werkzeug in der Erforschung des TH-Systems.

### 4.5.6 Zusammenfassung der Ergebnisse aus dem ED-Screening

Von den untersuchten Testsubstanzen scheinen besonders die antagonistischen ED von Bedeutung für eine Gefährdung der Gesundheit und der Umwelt zu sein. Unter Berücksichtigung von Daten zur Situation der Humanexposition einzelner Testsubstanzen und zu Effekten auf andere Endpunkte der TH-Achse muss auch einigen agonistischen ED verstärkte Aufmerksamkeit geschenkt werden. Bei den

## DISKUSSION

Antagonisten bieten sich TBBPA, BPA, 4MBC, 4NP, ACETO und eventuell auch XN als Kandidaten für weitere Analysen an. Unter den Agonisten empfehlen sich eingehendere Studien von GEN, BP2, BP3, OMC. Das synthetische Flavonoid weist Effekte auf, die es interessant für die Grundlagenforschung zum detaillierteren Verständnis der Eigenschaften von TR-Liganden machen könnte.

**Tab. 12: Die Effekte der Referenzsubstanzen und Thyroninderivate im Überblick**

Substanz	LOEC Aktivierungs-assay	max. Induktion Aktivierungs-assay	LOEC Kompetitions-assay	max. Effekt Kompetitions-assay
Thyroninderivate				
T <sub>3</sub>	100 pM ↑	122x ↑	n.d.	n.d.
T <sub>0</sub>	-	-	-	-
3-T <sub>1</sub>	3 µM ↑	6,6x ↑	300 nM ↓	0,4x ↓
3,3'-T <sub>2</sub>	10 nM ↑	56x ↑	1 µM ↑	1,5x ↑
3,5-T <sub>2</sub>	10 nM ↑	64x ↑	10 µM ↑	1,6x ↑
3',5'-T <sub>2</sub>	3 µM ↑	2,1x ↑	10 µM ↑	2,1x ↑
rT <sub>3</sub>	100 nM ↑	47x ↑	100 nM ↑	1,2x ↑
TRIAC	1 nM ↑	59x ↑	100 nM ↑	2,7x ↑
T <sub>3</sub> AM	10 nM ↑	58x ↑	1 µM ↑	2,1x ↑
Synthetischer Agonist oder Antagonist				
GC-1	1 nM ↑	79x ↑	10 nM ↑	3,2x ↑
NH-3	500 nM ↑	2,7x ↑	50 nM ↓	0,1x ↓

Tabelle 12 gibt eine Übersicht über Effekte der Referenzsubstanzen und der Thyroninderivate auf den T<sub>3</sub>-Reportergenassay wieder. In Spalte 2 werden die LOEC der Aktivierungsassays zusammengefasst. Spalte 3 gibt die maximalen Effekte der Substanzen in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle an. Die LOEC der T<sub>3</sub>-Kompetitionsassays sind in Spalte 3 eingetragen und Spalte 4 zeigt die maximalen Effekte der Substanzen im Kompetitionsassay. In rot mit nach oben zeigenden Pfeilen werden statistisch signifikante Induktionen der T<sub>3</sub>-Reportergenaktivität durch die Testsubstanzen dargestellt, während in blau und mit nach unten zeigenden Pfeilen reprimierende Effekte kenntlich gemacht werden. Nicht bestimmte Parameter sind mit n.d. beschriftet und ein Minus (-) weist auf das Fehlen statistisch signifikanter Effekte in den analysierten Konzentrationen hin.

## DISKUSSION

**Tab. 13: Die Effekte der Testsubstanzen im Überblick**

Substanz	LOEC Aktivierungs-assay	max. Induktion Aktivierungs-assay	LOEC Kompetitions-assay	max. Effekt Kompetitions-assay
Nahrungsmittelbestandteile				
API	10 µM ↑	2,6x ↑	10 µM ↑	1,8x ↑
GEN	1 µM ↑	2,3x ↑	1 µM ↑	1,2x ↑
HIS	10 µM ↑	1,6x ↑	10 µM ↑	1,3x ↑
MYR	10 µM ↑	1,5x ↑	-	-
NAR	1 µM ↑	1,4x ↑	-	-
RES	1 µM ↑	1,7x ↑	1 µM ↑	1,1x ↑
SIL	1 µM ↑	1,6x ↑	1 µM ↑	1,3x ↑
XN	10 µM ↑	2,0x ↑	10 µM ↓	0,7x ↓
UV-Absorber				
BP2	1 µM ↑	1,8x ↑	1 µM ↑	1,4x ↑
BP3	1 µM ↑	1,8x ↑	1 µM ↑	1,2x ↑
4MBC	1 µM ↑	1,3x ↑	10 µM ↓	0,5x ↓
OMC	1 µM ↑	1,5x ↑	-	-
Pestizide				
ACETO	-	-	10 µM ↓	0,7x ↓
LIN	1 µM ↑	1,7x ↑	1 µM ↑	1,2x ↑
NIT	-	-	-	-
PRO	10 µM ↑	1,8x ↑	10 µM ↑	1,4x ↑
Industriechemikalien				
BPA	1 µM ↑	1,6x ↑	1 µM ↓	0,8x ↓
DBP	1 µM ↑	1,6x ↑	-	-
4NP	100 nM ↑	1,9x ↑	1 µM ↓	0,7x ↓
TBBPA	10 µM ↑	1,4x ↑	1 µM ↓	0,1x ↓
Synthetisches Flavonoid				
F21388	100 nM ↑	2,8x ↑	5 µM ↓	0,5x ↓

Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse des ED-Screenings. In Spalte 2 werden die LOEC der Aktivierungsassays zusammengefasst. Spalte 3 gibt die maximalen Effekte der Substanzen in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle an. Die LOEC der T<sub>3</sub>-Kompetitionsassays sind in Spalte 3 eingetragen und Spalte 4 zeigt die maximalen Effekte der Substanzen im Kompetitionsassay. In rot mit nach oben zeigenden Pfeilen werden statistisch signifikante Induktionen der T<sub>3</sub>-Reportergenaktivität durch die Testsubstanzen dargestellt, während in blau und mit nach unten zeigenden Pfeilen reprimierende Effekte kenntlich gemacht werden. Ein Minus (-) weist auf das Fehlen statistisch signifikanter Effekte in den analysierten Konzentrationen hin.

### 4.5.7 Ausblick

Die mit diesem Screening Assay gewonnen Erkenntnisse können als Basis für die Auswahl von Substanzen für tierexperimentelle Versuche dienen. Für solche Untersuchungen von ED sollten aber zunächst genauere Daten zur Unterscheidung genereller toxikologischer Effekte von spezifischen endokrin disruptierenden Effekten erhoben werden. Ebenso sind mehr zuverlässige Daten über die physiologisch erreichten Konzentrationen der verschiedenen Testsubstanzen nötig, um eine Risikoabschätzung treffen zu können. Mit diesem Vorwissen könnten dann gezielte Experimente mit TH-Reportergentieren, die transgen für ein Reportergen unter der Kontrolle von TRE sind, geplant und durchgeführt werden (Ciana et al. 2003). TH-Reportergentiere böten für die Risikobewertung von ED den entscheidenden Vorteil, dass verschiedene Einzeleffekte von ED auf bestimmte Ziele der TH-Achse durch den Organismus integriert würden und dass am finalen Endpunkt der TH-Achse, der T<sub>3</sub>-vermittelten Genexpression, das Integral dieser Einzeleffekte bestimmt werden könnten. Dies würde dem kompensatorischen Potenzial des Hormonsystems bzw. des Gesamtorganismus' Rechnung tragen und wäre deshalb für eine Risikobewertung auch besser geeignet als die Untersuchung von Einzeleffekten auf bestimmte Vorgänge oder Moleküle. Zudem wäre eine organ- oder auch gewebespezifische Untersuchung der Netto-Effekte von ED möglich. Mit Techniken, wie dem *in vivo* imaging, bei dem die Reportergenaktivität von z. B. Luziferasebasierten Reportergenen mit einem empfindlichen Detektionssystem am lebenden Tier beobachtet werden können, wären auch Analysen zur systemischen Verteilung von aktiven ED möglich. Das Profil einer putativen entwicklungsspezifischen Wirkung von ED wäre mit einem solchen System ebenfalls zu erfassen. Eventuell könnten durch derartige Untersuchungen TR-, organ- und/oder entwicklungsspezifische endokrin aktive Substanzen identifiziert werden, von denen pharmazeutische Produkte abgeleitet werden könnten.

Die Europäische Union hat sich zum Ziel gesetzt, im Rahmen der neuen EU-Verordnung „REACH“ (**R**egistration, **E**valuation and **A**uthorisation of **C**hemicals) als Reform des europäischen Chemikalienrechts seit dem 01.07.2007 ein europaweites Chemikalienmanagement zur Gewährleistung der sicheren Verwendungen von Chemikalien zu etablieren (<http://www.reach-info.de/>). Dafür ist bis zum Juni 2018 die toxikologische Untersuchung von ca. 30.000 Substanzen, die pro Jahr in einer Masse von über einer Tonne neu produziert oder importiert werden, notwendig. In diesem Zusammenhang kann der hier entwickelte Assay einen wichtigen Beitrag leisten, um diese Substanzen in Hochdurchsatz auf TR-Agonisten und -Antagonisten zu screenen. Es wurden Befürchtungen geäußert, dass bei der Umsetzung der notwendigen

Untersuchungen im REACH-System eine enorme Steigerung der Zahl von Tierversuchen eintreten wird. Da es sich bei dem Reportergensystem um einen Zell-basierten Assay handelt, kann er ggf. auch zur Reduktion des Verbrauchs von Versuchstieren beitragen, indem durch Voruntersuchungen mit diesem System in Kombination mit anderen *in vitro* Assays bestimmte Substanzen für weitere Tests an Tieren ausgeschlossen werden könnten. Eine gut durchdachte und von ethischer Grundvorstellung geprägte Kombination von *in vitro* und *in vivo* Assays würde eine solche Entwicklung ebenfalls fördern.

## **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1: Beispiele für Wirkmechanismen von ED.....	3
Abb. 2: Konvertierung des Schilddrüsenhormons $T_4$ in das biologisch aktive $T_3$ .....	6
Abb. 3: Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR) .....	9
Abb. 4: Modell zur Regulation der Zielgenexpression durch $T_3$ .....	12
Abb. 5: Physiologische Wirkung von $T_3$ .....	15
Abb. 6: Firefly-Luziferase-Reaktion .....	42
Abb. 7: Renilla- oder Gaussia-Luziferase-Reaktion .....	43
Abb. 8: Klonierungsstrategie für $p(DR4)_1$ -SV40- <i>luc</i> + .....	45
Abb. 9: Konstruktion von $p(DR4)_1$ -SV40- <i>luc</i> + und $p(negTRE)_1$ -SV40- <i>luc</i> + .....	46
Abb. 10: Klonierungsstrategie für $p(DR4)_2$ -SV40- <i>luc</i> + .....	47
Abb. 11: Konstruktion von $p(DR4)_2$ -SV40- <i>luc</i> + und $p(negTRE)_3$ -SV40- <i>luc</i> + .....	48
Abb. 12: Konstruierte pGL3- $T_3$ -Reportergenplasmide .....	49
Abb. 13: $T_3$ -Reportergenplasmide zur stabilen Transfektion .....	49
Abb. 14: PolyFect-Transfektionsoptimierung für HeG2 Zellen.....	50
Abb. 15: Transfektionsoptimierung für das 96-Well Format.....	52
Abb. 16: Vergleich der Reportergenplasmide .....	53
Abb. 17: Vergleich der pBK-RSV-basierten Reportergenplasmide.....	53
Abb. 18: Suche nach geeigneten Zellen für das $T_3$ -Reportergensystem.....	55
Abb. 19: $T_3$ -Dosis-Wirkungskurve im Zeitverlauf .....	56
Abb. 20: Hintergrundaktivität von Medien .....	57
Abb. 21: Ermittlung der optimalen HepG2-Zellzahl zur Transfektion im 96-Well Maßstab.....	58
Abb. 22: Ermittlung der optimalen HepG2-Zellzahl pro 96-Well nach Pooltransfektion .....	59
Abb. 23: Vergleich von TR-Expressionsplasmiden .....	60
Abb. 24: $T_3$ -Dosis-Wirkungskurven in HepG2 Zellen nach optimiertem Protokoll .....	62
Abb. 25: Dosis-Wirkungskurve von GC-1 in $rTR\alpha_1$ -kotransfizierten HepG2.....	63
Abb. 26: Dosis-Wirkungskurve von NH-3 in $rTR\alpha_1$ -kotransfizierten HepG2 .....	65
Abb. 27: Effekte von GC-1, GC-24 und NH-3 in $hTR\beta_1$ -kotransfizierten HepG2 .....	66
Abb. 28: Dosis-Wirkungskurve von TRIAC und $T_3AM$ .....	68
Abb. 29: Dosis-Wirkungskurve verschiedener Thyroninderivate .....	69
Abb. 30: Screening von Nahrungsmittelbestandteilen .....	71
Abb. 31: Screening von UV-Filtern aus Kosmetika .....	72
Abb. 32: Screening von Pestiziden .....	74
Abb. 33: Screening von Industriechemikalien .....	75
Abb. 34: Effekte von F21388 im $T_3$ -Reportergenassay.....	77
Abb. 35: Einfluss der Testsubstanzen auf die Zellvitalität.....	78
Abb. 36: Potenzielle Ziele von ED im Schilddrüsenhormonsystem .....	98
Abb. 37: Plasmid-Sequenzen .....	154
Abb. 38: $T_3$ -Dosis-Wirkungskurven in HepG2 Zellen mit hormon-gestrippten FBS.....	154

### Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Plasmide.....	20
Tab. 2: Oligonukleotide zur Konstruktion von Reportergenplasmiden.....	21
Tab. 3: Primer zur Sequenzierung .....	21
Tab. 4: Bakterienstamm .....	22
Tab. 5: Geräte .....	22
Tab. 6: Verbrauchsmaterial .....	24
Tab. 7: Zelllinien .....	34
Tab. 8: T <sub>3</sub> -Verdünnungsreihe .....	38
Tab. 9: Testsubstanzen.....	39
Tab. 10: Optimierte Parameter für die Transfektion von HepG2 Zellen.....	51
Tab. 11: Weitere Nahrungsmittelbestandteile und ihre Induktionsfaktoren .....	71
Tab. 12: Die Effekte der Referenzsubstanzen und Thyroninderivate im Überblick .....	115
Tab. 13: Die Effekte der Testsubstanzen im Überblick.....	116



### Literaturverzeichnis

- Ahmed, S. A. (2000): The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field, *Toxicology* (Band 150), Nr. 1-3, Seite 191-206. URL: PM:10996675
- Alam, J. und Cook, J. L. (1990): Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription, *Anal.Biochem.* (Band 188), Nr. 2, Seite 245-254. URL: PM:2121064
- Anway, M. D.; Cupp, A. S.; Uzumcu, M. und Skinner, M. K. (2005): Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility, *Science* (Band 308), Nr. 5727, Seite 1466-1469. URL: PM:15933200
- Arcury, T. A.; Grzywacz, J. G.; Barr, D. B.; Tapia, J.; Chen, H. und Quandt, S. A. (2007): Pesticide urinary metabolite levels of children in eastern North Carolina farmworker households, *Environ.Health Perspect.* (Band 115), Nr. 8, Seite 1254-1260. URL: PM:17687456
- Audhya, T. K.; Segen, B. J. und Gibson, K. D. (1976): Stimulation of proteoglycan synthesis in chick embryo sternum by serum and L-3,5,3'-triiodothyronine, *J.Biol.Chem.* (Band 251), Nr. 12, Seite 3763-3767. URL: PM:132441
- Baker, M. E. (1998): Flavonoids as hormones. A perspective from an analysis of molecular fossils, *Adv.Exp.Med.Biol.* (Band 439), Seite 249-267. URL: PM:9781308
- Balinova, A. M.; Mladenova, R. I. und Shtereva, D. D. (2006): Effects of processing on pesticide residues in peaches intended for baby food, *Food Addit.Contam* (Band 23), Nr. 9, Seite 895-901. URL: PM:16901858
- Ball, S. G.; Sokolov, J. und Chin, W. W. (1997): 3,5-Diiodo-L-thyronine (T2) has selective thyromimetic effects in vivo and in vitro, *J.Mol.Endocrinol.* (Band 19), Nr. 2, Seite 137-147. URL: PM:9343306
- Baniahmad, A.; Kohne, A. C. und Renkawitz, R. (1992): A transferable silencing domain is present in the thyroid hormone receptor, in the v-erbA oncogene product and in the retinoic acid receptor, *EMBO J.* (Band 11), Nr. 3, Seite 1015-1023. URL: PM:1347744
- Barnard, J. C.; Williams, A. J.; Rabier, B.; Chassande, O.; Samarut, J.; Cheng, S. Y.; Bassett, J. H. und Williams, G. R. (2005): Thyroid hormones regulate fibroblast growth factor receptor signaling during chondrogenesis, *Endocrinology* (Band 146), Nr. 12, Seite 5568-5580. URL: PM:16150908
- Bassett, J. H.; Harvey, C. B. und Williams, G. R. (2003): Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions, *Mol.Cell Endocrinol.* (Band 213), Nr. 1, Seite 1-11. URL: PM:15062569
- Bassett, J. H.; Swinhoe, R.; Chassande, O.; Samarut, J. und Williams, G. R. (2006): Thyroid hormone regulates heparan sulfate proteoglycan expression in the growth plate, *Endocrinology* (Band 147), Nr. 1, Seite 295-305. URL: PM:16223867
- Bassett, J. H. und Williams, G. R. (2003): The molecular actions of thyroid hormone in bone, *Trends Endocrinol.Metab* (Band 14), Nr. 8, Seite 356-364. URL: PM:14516933
- Bauer, M. und Whybrow, P. C. (2001): Thyroid hormone, neural tissue and mood modulation, *World J.Biol.Psychiatry* (Band 2), Nr. 2, Seite 59-69. URL: PM:12587187

Baur, A.; Bauer, K.; Jarry, H. und Kohrle, J. (1997): 3,5-diiodo-L-thyronine stimulates type 1 5'deiodinase activity in rat anterior pituitaries in vivo and in reaggregate cultures and GH3 cells in vitro, *Endocrinology* (Band 138), Nr. 8, Seite 3242-3248. URL: PM:9231774

Bergh, J. J.; Lin, H. Y.; Lansing, L.; Mohamed, S. N.; Davis, F. B.; Mousa, S. und Davis, P. J. (2005): Integrin  $\alpha$ V $\beta$ 3 contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis, *Endocrinology* (Band 146), Nr. 7, Seite 2864-2871. URL: PM:15802494

Berthois, Y.; Katzenellenbogen, J. A. und Katzenellenbogen, B. S. (1986): Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 83), Nr. 8, Seite 2496-2500. URL: PM:3458212

Bhargava, M.; Lei, J.; Mariash, C. N. und Ingbar, D. H. (2007): Thyroid hormone rapidly stimulates alveolar Na,K-ATPase by activation of phosphatidylinositol 3-kinase, *Curr.Opin.Endocrinol.Diabetes Obes.* (Band 14), Nr. 5, Seite 416-420. URL: PM:17940473

Bhat, M. K.; Ashizawa, K. und Cheng, S. Y. (1994): Phosphorylation enhances the target gene sequence-dependent dimerization of thyroid hormone receptor with retinoid X receptor, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 91), Nr. 17, Seite 7927-7931. URL: PM:8058736

Bianco, A. C. und Kim, B. W. (2006): Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action, *J.Clin.Invest* (Band 116), Nr. 10, Seite 2571-2579. URL: PM:17016550

Bindal, R. D. und Katzenellenbogen, J. A. (1988): Bis(4-hydroxyphenyl)[2-(phenoxy-sulfonyl)phenyl]methane: isolation and structure elucidation of a novel estrogen from commercial preparations of phenol red (phenolsulfonphthalein), *J.Med.Chem.* (Band 31), Nr. 10, Seite 1978-1983. URL: PM:3172132

Bishop, C. A.; Brooks, R. J.; Carey, J. H.; Ng, P.; Norstrom, R. J. und Lean, D. R. (1991): The case for a cause-effect linkage between environmental contamination and development in eggs of the common snapping turtle (*Chelydra S.serpentina*) from Ontario, Canada, *J.Toxicol.EnvIRON.Health* (Band 33), Nr. 4, Seite 521-547. URL: PM:1908525

Böhme, K.; Conscience-Egli, M.; Tschann, T.; Winterhalter, K. H. und Bruckner, P. (1992): Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine, *J.Cell Biol.* (Band 116), Nr. 4, Seite 1035-1042. URL: PM:1734018

Borngraeber, S.; Budny, M. J.; Chiellini, G.; Cunha-Lima, S. T.; Togashi, M.; Webb, P.; Baxter, J. D.; Scanlan, T. S. und Fletterick, R. J. (2003): Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 100), Nr. 26, Seite 15358-15363. URL: PM:14673100

Botling, J.; Castro, D. S.; Oberg, F.; Nilsson, K. und Perlmann, T. (1997): Retinoic acid receptor/retinoid X receptor heterodimers can be activated through both subunits providing a basis for synergistic transactivation and cellular differentiation, *J.Biol.Chem.* (Band 272), Nr. 14, Seite 9443-9449. URL: PM:9083083

- Bottner, M.; Christoffel, J.; Jarry, H. und Wuttke, W. (2006): Effects of long-term treatment with resveratrol and subcutaneous and oral estradiol administration on pituitary function in rats, *J.Endocrinol.* (Band 189), Nr. 1, Seite 77-88. URL: PM:16614383
- Bourguet, W.; Ruff, M.; Bonnier, D.; Granger, F.; Boeglin, M.; Chambon, P.; Moras, D. und Gronemeyer, H. (1995): Purification, functional characterization, and crystallization of the ligand binding domain of the retinoid X receptor, *Protein Expr.Purif.* (Band 6), Nr. 5, Seite 604-608. URL: PM:8535152
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal.Biochem.* (Band 72), Seite 248-254. URL: PM:942051
- Bradley, D. J.; Towle, H. C. und Young, W. S., III (1992): Spatial and temporal expression of alpha- and beta-thyroid hormone receptor mRNAs, including the beta 2-subtype, in the developing mammalian nervous system, *J.Neurosci.* (Band 12), Nr. 6, Seite 2288-2302. URL: PM:1607941
- Brandon, E. F.; Bosch, T. M.; Deenen, M. J.; Levink, R.; van der, Wal E.; van Meerveld, J. B.; Bijl, M.; Beijnen, J. H.; Schellens, J. H. und Meijerman, I. (2006): Validation of in vitro cell models used in drug metabolism and transport studies; genotyping of cytochrome P450, phase II enzymes and drug transporter polymorphisms in the human hepatoma (HepG2), ovarian carcinoma (IGROV-1) and colon carcinoma (CaCo-2, LS180) cell lines, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* (Band 211), Nr. 1, Seite 1-10. URL: PM:15975613
- Brandsma, A. E.; Tibboel, D.; Vulto, I. M.; de Vijlder, J. J.; Have-Opbroek, A. A. und Wiersinga, W. M. (1994): Inhibition of T3-receptor binding by Nitrofen, *Biochim.Biophys.Acta* (Band 1201), Nr. 2, Seite 266-270. URL: PM:7947941
- Brawer, J. R.; Naftolin, F.; Martin, J. und Sonnenschein, C. (1978): Effects of a single injection of estradiol valerate on the hypothalamic arcuate nucleus and on reproductive function in the female rat, *Endocrinology* (Band 103), Nr. 2, Seite 501-512. URL: PM:744098
- Brotons, J. A.; Olea-Serrano, M. F.; Villalobos, M.; Pedraza, V. und Olea, N. (1995): Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans, *Environ.Health Perspect.* (Band 103), Nr. 6, Seite 608-612. URL: PM:7556016
- Brzozowski, A. M.; Pike, A. C.; Dauter, Z.; Hubbard, R. E.; Bonn, T.; Engstrom, O.; Ohman, L.; Greene, G. L.; Gustafsson, J. A. und Carlquist, M. (1997): Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor, *Nature* (Band 389), Nr. 6652, Seite 753-758. URL: PM:9338790
- Burch, W. M. und Lebovitz, H. E. (1982): Triiodothyronine stimulation of in vitro growth and maturation of embryonic chick cartilage, *Endocrinology* (Band 111), Nr. 2, Seite 462-468. URL: PM:7094881
- Burch, W. M. und Van Wyk, J. J. (1987): Triiodothyronine stimulates cartilage growth and maturation by different mechanisms, *Am.J.Physiol* (Band 252), Nr. 2 Pt 1, Seite E176-E182. URL: PM:3826339
- Burman, K. D.; Dimond, R. C.; Wright, F. D.; Earll, J. M.; Bruton, J. und Wartofsky, L. (1977): A radioimmunoassay for 3,3',5'-L-triiodothyronine (reverse T3): assessment of thyroid gland content and serum measurements in conditions of normal and altered thyroidal economy and following administration of thyrotropin releasing hormone (TRH)

and thyrotropin (TSH), *J.Clin.Endocrinol.Metab* (Band 44), Nr. 4, Seite 660-672. URL: PM:191466

Calafat, A. M.; Kuklennyik, Z.; Reidy, J. A.; Caudill, S. P.; Ekong, J. und Needham, L. L. (2005): Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population, *Environ.Health Perspect.* (Band 113), Nr. 4, Seite 391-395. URL: PM:15811827

Cao, X.; Kambe, F.; Moeller, L. C.; Refetoff, S. und Seo, H. (2005): Thyroid Hormone Induces Rapid Activation of Akt/Protein Kinase B-Mammalian Target of Rapamycin-p70S6K Cascade through Phosphatidylinositol 3-Kinase in Human Fibroblasts, *Mol.Endocrinol.* (Band 19), Nr. 1, Seite 102-112. URL: PM:15388791

Carson, Rachel (1962): *Silent Spring*, Houghton Mifflin.

Casla, A.; Rovira, A.; Wells, J. A. und Dohm, G. L. (1990): Increased glucose transporter (GLUT4) protein expression in hyperthyroidism, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (Band 171), Nr. 1, Seite 182-188. URL: PM:2203344

Chang, L. und Wei, L. N. (1997): Characterization of a negative response DNA element in the upstream region of the cellular retinoic acid-binding protein-I gene of the mouse, *J.Biol.Chem.* (Band 272), Nr. 15, Seite 10144-10150. URL: PM:9092560

Chassande, O.; Fraichard, A.; Gauthier, K.; Flamant, F.; Legrand, C.; Savatier, P.; Laudet, V. und Samarut, J. (1997): Identification of transcripts initiated from an internal promoter in the c-erbA alpha locus that encode inhibitors of retinoic acid receptor-alpha and triiodothyronine receptor activities, *Mol.Endocrinol.* (Band 11), Nr. 9, Seite 1278-1290. URL: PM:9259319

Cheek, A. O.; Ide, C. F.; Bollinger, J. E.; Rider, C. V. und McLachlan, J. A. (1999): Alteration of leopard frog (*Rana pipiens*) metamorphosis by the herbicide acetochlor, *Arch.Environ.Contam Toxicol.* (Band 37), Nr. 1, Seite 70-77. URL: PM:10341044

Chen, J. D. und Evans, R. M. (1995): A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors, *Nature* (Band 377), Nr. 6548, Seite 454-457. URL: PM:7566127

Chiellini, G.; Apriletti, J. W.; Yoshihara, H. A.; Baxter, J. D.; Ribeiro, R. C. und Scanlan, T. S. (1998): A high-affinity subtype-selective agonist ligand for the thyroid hormone receptor, *Chem.Biol.* (Band 5), Nr. 6, Seite 299-306. URL: PM:9653548

Chopra, I. J. (1976): An assessment of daily production and significance of thyroidal secretion of 3, 3', 5'-triiodothyronine (reverse T3) in man, *J.Clin.Invest* (Band 58), Nr. 1, Seite 32-40. URL: PM:932209

Chopra, I. J. (1977): A study of extrathyroidal conversion of thyroxine (T4) to 3,3',5'-triiodothyronine (T3) in vitro, *Endocrinology* (Band 101), Nr. 2, Seite 453-463. URL: PM:18337

Chopra, I. J.; Chopra, U.; Smith, S. R.; Reza, M. und Solomon, D. H. (1975): Reciprocal changes in serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine (T3) in systemic illnesses, *J.Clin.Endocrinol.Metab* (Band 41), Nr. 06, Seite 1043-1049. URL: PM:812882

Chopra, I. J.; Geola, F.; Solomon, D. H. und Maciel, R. M. (1978): 3'-5'-Diiodothyronine in health and disease: studies by a radioimmunoassay, *J.Clin.Endocrinol.Metab* (Band 47), Nr. 6, Seite 1198-1207. URL: PM:263734

Chopra, I. J.; Wu, S. Y.; Tecu, G. N. und Santini, F. (1992): A radioimmunoassay for measurement of 3,5,3'-triiodothyronine sulfate: studies in thyroidal and nonthyroidal diseases, pregnancy, and neonatal life, *J.Clin.Endocrinol.Metab* (Band 75), Nr. 1, Seite 189-194. URL: PM:1619009

Ciana, P.; Raviscioni, M.; Mussi, P.; Vegeto, E.; Que, I.; Parker, M. G.; Lowik, C. und Maggi, A. (2003): In vivo imaging of transcriptionally active estrogen receptors, *Nat.Med.* (Band 9), Nr. 1, Seite 82-86. URL: PM:12483206

Cody, V.; Davis, P. J. und Davis, F. B. (2007): Molecular modeling of the thyroid hormone interactions with alpha v beta 3 integrin, *Steroids* (Band 72), Nr. 2, Seite 165-170. URL: PM:17166537

Cody, V.; Meyer, T.; Dohler, K. D.; Hesch, R. D.; Rokos, H. und Marko, M. (1984): Molecular structure and biochemical activity of 3,5,3'-triiodothyronamine, *Endocr.Res.* (Band 10), Nr. 2, Seite 91-99. URL: PM:6094171

Colborn, T.; vom Saal, F. S. und Soto, A. M. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans, *Environ.Health Perspect.* (Band 101), Nr. 5, Seite 378-384. URL: PM:8080506

Contieri, Abad F.; Winck, P. R.; Benvenuti, E. V.; do Carmo Ruaro, Peralba M.; Bastos, Caramao E. und Alcaraz, Zini C. (2007): p-Nitro-N-propylaniline/silica: synthesis, characterization, and its application in matrix solid phase dispersion for multiresidue analysis of pesticides in carrots, *J.Sep.Sci.* (Band 30), Nr. 13, Seite 2109-2116. URL: PM:17657829

Cook, C. B.; Kakucska, I.; Lechan, R. M. und Koenig, R. J. (1992): Expression of thyroid hormone receptor beta 2 in rat hypothalamus, *Endocrinology* (Band 130), Nr. 2, Seite 1077-1079. URL: PM:1733708

Cooke, G. M.; Tryphonas, H.; Pulido, O.; Caldwell, D.; Bondy, G. S. und Forsyth, D. (2004): Oral (gavage), in utero and postnatal exposure of Sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride. Part 1: Toxicology, histopathology and clinical chemistry, *Food Chem.Toxicol.* (Band 42), Nr. 2, Seite 211-220. URL: PM:14667468

Corcoran, J. M. und Eastman, C. J. (1983): Radioimmunoassay of 3-L- monoiodothyronine: application in normal human physiology and thyroid disease, *J.Clin.Endocrinol.Metab* (Band 57), Nr. 1, Seite 66-70. URL: PM:6853682

Crews, D.; Gore, A. C.; Hsu, T. S.; Dangleben, N. L.; Spinetta, M.; Schallert, T.; Anway, M. D. und Skinner, M. K. (2007): Transgenerational epigenetic imprints on mate preference, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 104), Nr. 14, Seite 5942-5946. URL: PM:17389367

Crump, D.; Werry, K.; Veldhoen, N.; Van Aggelen, G. und Helbing, C. C. (2002): Exposure to the herbicide acetochlor alters thyroid hormone-dependent gene expression and metamorphosis in *Xenopus Laevis*, *Environ.Health Perspect.* (Band 110), Nr. 12, Seite 1199-1205. URL: PM:12460798

Dai, G.; Levy, O. und Carrasco, N. (1996): Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter, *Nature* (Band 379), Nr. 6564, Seite 458-460. URL: PM:8559252

Darimont, B. D.; Wagner, R. L.; Apriletti, J. W.; Stallcup, M. R.; Kushner, P. J.; Baxter, J. D.; Fletterick, R. J. und Yamamoto, K. R. (1998): Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions, *Genes Dev.* (Band 12), Nr. 21, Seite 3343-3356. URL: PM:9808622

- Davis, P. J. und Davis, F. B. (2002): Nongenomic actions of thyroid hormone on the heart, *Thyroid* (Band 12), Nr. 6, Seite 459-466. URL: PM:12165107
- Davis, P. J.; Davis, F. B. und Cody, V. (2005): Membrane receptors mediating thyroid hormone action, *Trends Endocrinol.Metab* (Band 16), Nr. 9, Seite 429-435. URL: PM:16214361
- Davis, P. J.; Leonard, J. L. und Davis, F. B. (2007): Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone, *Front Neuroendocrinol.* URL: PM:17983645
- Davis, P. J.; Shih, A.; Lin, H. Y.; Martino, L. J. und Davis, F. B. (2000): Thyroxine promotes association of mitogen-activated protein kinase and nuclear thyroid hormone receptor (TR) and causes serine phosphorylation of TR, *J.Biol.Chem.* (Band 275), Nr. 48, Seite 38032-38039. URL: PM:10982791
- de Lange, P.; Lanni, A.; Beneduce, L.; Moreno, M.; Lombardi, A.; Silvestri, E. und Goglia, F. (2001): Uncoupling protein-3 is a molecular determinant for the regulation of resting metabolic rate by thyroid hormone, *Endocrinology* (Band 142), Nr. 8, Seite 3414-3420. URL: PM:11459785
- Deo, S. K. und Daunert, S. (2001): Luminescent proteins from *Aequorea victoria*: applications in drug discovery and in high throughput analysis, *Fresenius.J.Anal.Chem.* (Band 369), Nr. 3-4, Seite 258-266. URL: PM:11293702
- DeVito, M.; Biegel, L.; Brouwer, A.; Brown, S.; Brucker-Davis, F.; Cheek, A. O.; Christensen, R.; Colborn, T.; Cooke, P.; Crissman, J.; Crofton, K.; Doerge, D.; Gray, E.; Hauser, P.; Hurley, P.; Kohn, M.; Lazar, J.; McMaster, S.; McClain, M.; McConnell, E.; Meier, C.; Miller, R.; Tietge, J. und Tyl, R. (1999): Screening methods for thyroid hormone disruptors, *Environ.Health Perspect.* (Band 107), Nr. 5, Seite 407-415. URL: PM:10210697
- Divi, R. L.; Chang, H. C. und Doerge, D. R. (1997): Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action, *Biochem.Pharmacol.* (Band 54), Nr. 10, Seite 1087-1096. URL: PM:9464451
- Doerge, D. R. und Sheehan, D. M. (2002): Goitrogenic and estrogenic activity of soy isoflavones, *Environ.Health Perspect.* (Band 110 Suppl 3), Seite 349-353. URL: PM:12060828
- Dunn, J. T. und STANBURY, J. B. (1958): The metabolism of 3:3':5'-triiodothyronine in man, *J.Clin.Endocrinol.Metab* (Band 18), Nr. 7, Seite 713-720. URL: PM:13549549
- Dupre, S. M.; Guissouma, H.; Flamant, F.; Seugnet, I.; Scanlan, T. S.; Baxter, J. D.; Samarut, J.; Demeneix, B. A. und Becker, N. (2004): Both thyroid hormone receptor (TR)beta 1 and TR beta 2 isoforms contribute to the regulation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone, *Endocrinology* (Band 145), Nr. 5, Seite 2337-2345. URL: PM:14726446
- Dyess, E. M.; Segerson, T. P.; Liposits, Z.; Paull, W. K.; Kaplan, M. M.; Wu, P.; Jackson, I. M. und Lechan, R. M. (1988): Triiodothyronine exerts direct cell-specific regulation of thyrotropin-releasing hormone gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus, *Endocrinology* (Band 123), Nr. 5, Seite 2291-2297. URL: PM:3139393
- Elnour, A.; Lieden, S.; Bourdoux, P.; Eltom, M.; Khalid, S. A. und Hambraeus, L. (1998): Traditional fermentation increases goitrogenic activity in pearl millet, *Ann.Nutr.Metab* (Band 42), Nr. 6, Seite 341-349. URL: PM:9895422

- Engler, D.; Merkelbach, U.; Steiger, G. und Burger, A. G. (1984): The monodeiodination of triiodothyronine and reverse triiodothyronine in man: a quantitative evaluation of the pathway by the use of turnover rate techniques, *J.Clin.Endocrinol.Metab* (Band 58), Nr. 1, Seite 49-61. URL: PM:6689682
- European Commission (1996): European workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife, Weybridge, 2-4 Dec. 1996, Environment and Climate Research Programme, DG XII, Report Eur 17549.
- Evans, R. M. (2005): The nuclear receptor superfamily: a rosetta stone for physiology, *Mol.Endocrinol.* (Band 19), Nr. 6, Seite 1429-1438. URL: PM:15914712
- Evans, R. M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily, *Science* (Band 240), Nr. 4854, Seite 889-895. URL: PM:3283939
- Faber, J.; Kirkegaard, C.; Lumholtz, I. B.; Siersbaek-Nielsen, K. und Friis, T. (1979): Measurements of serum 3',5'-diiodothyronine and 3,3'-diiodothyronine concentrations in normal subjects and in patients with thyroid and nonthyroid disease: studies of 3',5'-diiodothyronine metabolism, *J.Clin.Endocrinol.Metab* (Band 48), Nr. 4, Seite 611-617. URL: PM:429507
- Faber, J.; Thomsen, H. F.; Lumholtz, I. B.; Kirkegaard, C.; Siersbaek-Nielsen, K. und Friis, T. (1981): Kinetic studies of thyroxine, 3,5,3'-triiodothyronine, 3,3,5'-triiodothyronine, 3',5'-diiodothyronine, 3,3'-diiodothyronine, and 3'-monoiodothyronine in patients with liver cirrhosis, *J.Clin.Endocrinol.Metab* (Band 53), Nr. 5, Seite 978-984. URL: PM:7287881
- Fei, X.; Chung, H. und Taylor, H. S. (2005): Methoxychlor disrupts uterine Hoxa10 gene expression, *Endocrinology* (Band 146), Nr. 8, Seite 3445-3451. URL: PM:15890768
- Feng, W.; Ribeiro, R. C.; Wagner, R. L.; Nguyen, H.; Apriletti, J. W.; Fletterick, R. J.; Baxter, J. D.; Kushner, P. J. und West, B. L. (1998): Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors, *Science* (Band 280), Nr. 5370, Seite 1747-1749. URL: PM:9624051
- Feng, X.; Jiang, Y.; Meltzer, P. und Yen, P. M. (2000): Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray, *Mol.Endocrinol.* (Band 14), Nr. 7, Seite 947-955. URL: PM:10894146
- Flamant, F.; Baxter, J. D.; Forrest, D.; Refetoff, S.; Samuels, H.; Scanlan, T. S.; Vennstrom, B. und Samarut, J. (2006): International Union of Pharmacology. LIX. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: thyroid hormone receptors, *Pharmacol.Rev.* (Band 58), Nr. 4, Seite 705-711. URL: PM:17132849
- Flamant, F. und Samarut, J. (2003): Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice, *Trends Endocrinol.Metab* (Band 14), Nr. 2, Seite 85-90. URL: PM:12591179
- Flores-Morales, A.; Gullberg, H.; Fernandez, L.; Stahlberg, N.; Lee, N. H.; Vennstrom, B. und Norstedt, G. (2002): Patterns of liver gene expression governed by TRbeta, *Mol.Endocrinol.* (Band 16), Nr. 6, Seite 1257-1268. URL: PM:12040013
- Force, W. R.; Tillman, J. B.; Sprung, C. N. und Spindler, S. R. (1994): Homodimer and heterodimer DNA binding and transcriptional responsiveness to triiodothyronine (T3) and 9-cis-retinoic acid are determined by the number and order of high affinity half-

sites in a T3 response element, J.Biol.Chem. (Band 269), Nr. 12, Seite 8863-8871.  
URL: PM:8132622

Forrest, D. und Vennström, B. (2000): Functions of thyroid hormone receptors in mice, Thyroid (Band 10), Nr. 1, Seite 41-52. URL: PM:10691312

Fox, J. E.; Starcevic, M.; Jones, P. E.; Burow, M. E. und McLachlan, J. A. (2004): Phytoestrogen signaling and symbiotic gene activation are disrupted by endocrine-disrupting chemicals, Environ.Health Perspect. (Band 112), Nr. 6, Seite 672-677. URL: PM:15121509

Fox, J. E.; Starcevic, M.; Kow, K. Y.; Burow, M. E. und McLachlan, J. A. (2001): Nitrogen fixation. Endocrine disrupters and flavonoid signalling, Nature (Band 413), Nr. 6852, Seite 128-129. URL: PM:11557969

Franke, A. A.; Halm, B. M.; Custer, L. J.; Tatsumura, Y. und Hebshi, S. (2006): Isoflavones in breastfed infants after mothers consume soy, Am.J.Clin.Nutr. (Band 84), Nr. 2, Seite 406-413. URL: PM:16895891

Friesema, E. C.; Docter, R.; Moerings, E. P.; Stieger, B.; Hagenbuch, B.; Meier, P. J.; Krenning, E. P.; Hennemann, G. und Visser, T. J. (1999): Identification of thyroid hormone transporters, Biochem.Biophys.Res.Comm. (Band 254), Nr. 2, Seite 497-501. URL: PM:9918867

Friesema, E. C.; Jansen, J.; Heuer, H.; Trajkovic, M.; Bauer, K. und Visser, T. J. (2006): Mechanisms of disease: psychomotor retardation and high T3 levels caused by mutations in monocarboxylate transporter 8, Nat.Clin.Pract.Endocrinol.Metab (Band 2), Nr. 9, Seite 512-523. URL: PM:16957765

Friesema, E. C.; Jansen, J.; Milici, C. und Visser, T. J. (2005): Thyroid hormone transporters, Vitam.Horm. (Band 70), Seite 137-167. URL: PM:15727804

Fry, D. M. und Toone, C. K. (1981): DDT-induced feminization of gull embryos, Science (Band 213), Nr. 4510, Seite 922-924. URL: PM:7256288

Furlow, J. D. und Brown, D. D. (1999): In vitro and in vivo analysis of the regulation of a transcription factor gene by thyroid hormone during *Xenopus laevis* metamorphosis, Mol.Endocrinol. (Band 13), Nr. 12, Seite 2076-2089. URL: PM:10598583

Furlow, J. D.; Yang, H. Y.; Hsu, M.; Lim, W.; Ermio, D. J.; Chiellini, G. und Scanlan, T. S. (2004): Induction of larval tissue resorption in *Xenopus laevis* tadpoles by the thyroid hormone receptor agonist GC-1, J.Biol.Chem. (Band 279), Nr. 25, Seite 26555-26562. URL: PM:15056670

Garcia, G.; Lopez-Bojorquez, L.; Nunez, J.; Valverde, R. und Orozco, A. (2007): 3,5-Diiodothyronine in vivo maintains euthyroidal expression of type 2 iodothyronine deiodinase, growth hormone, and thyroid hormone receptor beta1 in the killifish, Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp Physiol (Band 293), Nr. 2, Seite R877-R883. URL: PM:17522123

Gerhäuser, C. (2005): Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents, Eur.J.Cancer (Band 41), Nr. 13, Seite 1941-1954. URL: PM:15953717

Gershengorn, M. C.; Cheng, S. Y.; Lippoldt, R. E.; Lord, R. S. und Robbins, J. (1977): Characterization of human thyroxine-binding globulin. Evidence for a single polypeptide chain, J.Biol.Chem. (Band 252), Nr. 23, Seite 8713-8718. URL: PM:21881



- Ghisari, M. und Bonefeld-Jorgensen, E. C. (2005): Impact of environmental chemicals on the thyroid hormone function in pituitary rat GH3 cells, *Mol.Cell Endocrinol.* (Band 244), Nr. 1-2, Seite 31-41. URL: PM:16221524
- Giustina, A. und Wehrenberg, W. B. (1995): Influence of thyroid hormones on the regulation of growth hormone secretion, *Eur.J.Endocrinol.* (Band 133), Nr. 6, Seite 646-653. URL: PM:8548047
- Glass, C. K. (1994): Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers, and heterodimers, *Endocr.Rev.* (Band 15), Nr. 3, Seite 391-407. URL: PM:8076589
- Goglia, F. (2005): Biological effects of 3,5-diiodothyronine (T(2)), *Biochemistry (Mosc.)* (Band 70), Nr. 2, Seite 164-172. URL: PM:15807655
- Goldfine, I. D.; Smith, G. J.; Simons, C. G.; Ingbar, S. H. und Jorgensen, E. C. (1976): Activities of thyroid hormones and related compounds in an in vitro thymocyte assay, *J.Biol.Chem.* (Band 251), Nr. 14, Seite 4233-4238. URL: PM:932030
- Gonzalez, H.; Farbroth, A.; Larko, O. und Wennberg, A. M. (2006): Percutaneous absorption of the sunscreen benzophenone-3 after repeated whole-body applications, with and without ultraviolet irradiation, *Br.J.Dermatol.* (Band 154), Nr. 2, Seite 337-340. URL: PM:16433806
- Gray, L. E.; Ostby, J.; Furr, J.; Wolf, C. J.; Lambright, C.; Parks, L.; Veeramachaneni, D. N.; Wilson, V.; Price, M.; Hotchkiss, A.; Orlando, E. und Guillette, L. (2001): Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals, *Hum.Reprod.Update.* (Band 7), Nr. 3, Seite 248-264. URL: PM:11392371
- Grover, G. J.; Mellstrom, K.; Ye, L.; Malm, J.; Li, Y. L.; Bladh, L. G.; Sleph, P. G.; Smith, M. A.; George, R.; Vennstrom, B.; Mookhtiar, K.; Horvath, R.; Speelman, J.; Egan, D. und Baxter, J. D. (2003): Selective thyroid hormone receptor-beta activation: a strategy for reduction of weight, cholesterol, and lipoprotein (a) with reduced cardiovascular liability, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 100), Nr. 17, Seite 10067-10072. URL: PM:12888625
- Guadano-Ferraz, A.; Escamez, M. J.; Morte, B.; Vargiu, P. und Bernal, J. (1997): Transcriptional induction of RC3/neurogranin by thyroid hormone: differential neuronal sensitivity is not correlated with thyroid hormone receptor distribution in the brain, *Brain Res.Mol.Brain Res.* (Band 49), Nr. 1-2, Seite 37-44. URL: PM:9387861
- Guenther, M. G.; Barak, O. und Lazar, M. A. (2001): The SMRT and N-CoR corepressors are activating cofactors for histone deacetylase 3, *Mol.Cell Biol.* (Band 21), Nr. 18, Seite 6091-6101. URL: PM:11509652
- Guillette, L. J., Jr. (2006): Endocrine disrupting contaminants--beyond the dogma, *Environ.Health Perspect.* (Band 114 Suppl 1), Seite 9-12. URL: PM:16818240
- Guillette, L. J., Jr.; Gross, T. S.; Masson, G. R.; Matter, J. M.; Percival, H. F. und Woodward, A. R. (1994): Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida, *Environ.Health Perspect.* (Band 102), Nr. 8, Seite 680-688. URL: PM:7895709
- Gullberg, H.; Rudling, M.; Forrest, D.; Angelin, B. und Vennstrom, B. (2000): Thyroid hormone receptor beta-deficient mice show complete loss of the normal cholesterol 7alpha-hydroxylase (CYP7A) response to thyroid hormone but display enhanced

resistance to dietary cholesterol, *Mol.Endocrinol.* (Band 14), Nr. 11, Seite 1739-1749. URL: PM:11075809

Gullberg, H.; Rudling, M.; Salto, C.; Forrest, D.; Angelin, B. und Vennstrom, B. (2002): Requirement for thyroid hormone receptor beta in T3 regulation of cholesterol metabolism in mice, *Mol.Endocrinol.* (Band 16), Nr. 8, Seite 1767-1777. URL: PM:12145333

Hall, T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucl.Acids.Symp.Ser.*

Hamann, I.; Seidlova-Wuttke, D.; Wuttke, W. und Kohrle, J. (2006): Effects of isoflavonoids and other plant-derived compounds on the hypothalamus-pituitary-thyroid hormone axis, *Maturitas.* URL: PM:16904276

Harbers, M.; Wahlstrom, G. M. und Vennstrom, B. (1996): Transactivation by the thyroid hormone receptor is dependent on the spacer sequence in hormone response elements containing directly repeated half-sites, *Nucleic Acids Res.* (Band 24), Nr. 12, Seite 2252-2259. URL: PM:8710493

Harvey, C. B.; O'Shea, P. J.; Scott, A. J.; Robson, H.; Siebler, T.; Shalet, S. M.; Samarut, J.; Chassande, O. und Williams, G. R. (2002): Molecular mechanisms of thyroid hormone effects on bone growth and function, *Mol.Genet.Metab* (Band 75), Nr. 1, Seite 17-30. URL: PM:11825060

Harvey, C. B. und Williams, G. R. (2002): Mechanism of thyroid hormone action, *Thyroid* (Band 12), Nr. 6, Seite 441-446. URL: PM:12165104

Heinzel, T.; Lavinsky, R. M.; Mullen, T. M.; Soderstrom, M.; Laherty, C. D.; Torchia, J.; Yang, W. M.; Brard, G.; Ngo, S. D.; Davie, J. R.; Seto, E.; Eisenman, R. N.; Rose, D. W.; Glass, C. K. und Rosenfeld, M. G. (1997): A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression, *Nature* (Band 387), Nr. 6628, Seite 43-48. URL: PM:9139820

Helbing, C. C.; Ovaska, K. und Ji, L. (2006): Evaluation of the effect of acetochlor on thyroid hormone receptor gene expression in the brain and behavior of *Rana catesbeiana* tadpoles, *Aquat.Toxicol.* URL: PM:16949162

Hetzel, B. S. (2000): Iodine and neuropsychological development, *J.Nutr.* (Band 130), Nr. 2S Suppl, Seite 493S-495S. URL: PM:10721937

Heyland, A. und Moroz, L. L. (2005): Cross-kingdom hormonal signaling: an insight from thyroid hormone functions in marine larvae, *J.Exp.Biol.* (Band 208), Nr. Pt 23, Seite 4355-4361. URL: PM:16339856

Heyland, A.; Reitzel, A. M. und Hodin, J. (2004): Thyroid hormones determine developmental mode in sand dollars (Echinodermata: Echinoidea), *Evol.Dev.* (Band 6), Nr. 6, Seite 382-392. URL: PM:15509220

Hiroi, Y.; Kim, H. H.; Ying, H.; Furuya, F.; Huang, Z.; Simoncini, T.; Noma, K.; Ueki, K.; Nguyen, N. H.; Scanlan, T. S.; Moskowitz, M. A.; Cheng, S. Y. und Liao, J. K. (2006): Rapid nongenomic actions of thyroid hormone, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 103), Nr. 38, Seite 14104-14109. URL: PM:16966610

Hodin, R. A.; Lazar, M. A. und Chin, W. W. (1989): The pituitary-specific form of rat c-erbA is a biologically active thyroid hormone receptor, *Curr.Surg.* (Band 46), Nr. 4, Seite 298-301. URL: PM:2548813

- Hodin, R. A.; Lazar, M. A. und Chin, W. W. (1990): Differential and tissue-specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone, *J.Clin.Invest* (Band 85), Nr. 1, Seite 101-105. URL: PM:2153150
- Horlein, A. J.; Naar, A. M.; Heinzl, T.; Torchia, J.; Gloss, B.; Kurokawa, R.; Ryan, A.; Kamei, Y.; Soderstrom, M.; Glass, C. K. und . (1995): Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor, *Nature* (Band 377), Nr. 6548, Seite 397-404. URL: PM:7566114
- Horst, C.; Rokos, H. und Seitz, H. J. (1989): Rapid stimulation of hepatic oxygen consumption by 3,5-di-iodo-L-thyronine, *Biochem.J.* (Band 261), Nr. 3, Seite 945-950. URL: PM:2803254
- Houtman, C. J.; Cenijn, P. H.; Hamers, T.; Lamoree, M. H.; Legler, J.; Murk, A. J. und Brouwer, A. (2004): Toxicological profiling of sediments using in vitro bioassays, with emphasis on endocrine disruption, *Environ.Toxicol.Chem.* (Band 23), Nr. 1, Seite 32-40. URL: PM:14768864
- Howdeshell, K. L. (2002): A model of the development of the brain as a construct of the thyroid system, *Environ.Health Perspect.* (Band 110 Suppl 3), Seite 337-348. URL: PM:12060827
- Hu, X. und Lazar, M. A. (1999): The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors, *Nature* (Band 402), Nr. 6757, Seite 93-96. URL: PM:10573424
- Hydovitz, J. D. (1960): Occurrence of goiter in an infant on a soy diet, *N.Engl.J.Med.* (Band 262), Seite 351-353. URL: PM:14405715
- Inoue, K.; Kato, K.; Yoshimura, Y.; Makino, T. und Nakazawa, H. (2000): Determination of bisphenol A in human serum by high-performance liquid chromatography with multi-electrode electrochemical detection, *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* (Band 749), Nr. 1, Seite 17-23. URL: PM:11129074
- Irvine, C. H.; Fitzpatrick, M. G. und Alexander, S. L. (1998): Phytoestrogens in soy-based infant foods: concentrations, daily intake, and possible biological effects, *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* (Band 217), Nr. 3, Seite 247-253. URL: PM:9492332
- Ishizuka, T. und Lazar, M. A. (2003): The N-CoR/histone deacetylase 3 complex is required for repression by thyroid hormone receptor, *Mol.Cell Biol.* (Band 23), Nr. 15, Seite 5122-5131. URL: PM:12861000
- Iwamuro, S.; Sakakibara, M.; Terao, M.; Ozawa, A.; Kurobe, C.; Shigeura, T.; Kato, M. und Kikuyama, S. (2003): Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*, *Gen.Comp Endocrinol.* (Band 133), Nr. 2, Seite 189-198. URL: PM:12928009
- Jagnytsh, O.; Opitz, R.; Lutz, I. und Kloas, W. (2006): Effects of tetrabromobisphenol A on larval development and thyroid hormone-regulated biomarkers of the amphibian *Xenopus laevis*, *Environ.Res.* (Band 101), Nr. 3, Seite 340-348. URL: PM:16290818
- Jain, V. K. und Magrath, I. T. (1991): A chemiluminescent assay for quantitation of beta-galactosidase in the femtogram range: application to quantitation of beta-galactosidase in lacZ-transfected cells, *Anal.Biochem.* (Band 199), Nr. 1, Seite 119-124. URL: PM:1807155

Jakobs, T. C.; Schmutzler, C.; Meissner, J. und Kohrle, J. (1997): The promoter of the human type I 5'-deiodinase gene--mapping of the transcription start site and identification of a DR+4 thyroid-hormone-responsive element, *Eur.J.Biochem.* (Band 247), Nr. 1, Seite 288-297. URL: PM:9249039

Janjua, N. R.; Kongshoj, B.; Petersen, J. H. und Wulf, H. C. (2007): Sunscreens and thyroid function in humans after short-term whole-body topical application: a single-blinded study, *Br.J.Dermatol.* (Band 156), Nr. 5, Seite 1080-1082. URL: PM:17381456

Janjua, N. R.; Mogensen, B.; Andersson, A. M.; Petersen, J. H.; Henriksen, M.; Skakkebaek, N. E. und Wulf, H. C. (2004): Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans, *J.Invest Dermatol.* (Band 123), Nr. 1, Seite 57-61. URL: PM:15191542

Jarry, H.; Christoffel, J.; Rimoldi, G.; Koch, L. und Wuttke, W. (2004): Multi-organic endocrine disrupting activity of the UV screen benzophenone 2 (BP2) in ovariectomized adult rats after 5 days treatment, *Toxicology* (Band 205), Nr. 1-2, Seite 87-93. URL: PM:15458793

Jiang, R.; Roberts, M. S.; Collins, D. M. und Benson, H. A. (1999): Absorption of sunscreens across human skin: an evaluation of commercial products for children and adults, *Br.J.Clin.Pharmacol.* (Band 48), Nr. 4, Seite 635-637. URL: PM:10583038

Jirtle, R. L. und Skinner, M. K. (2007): Environmental epigenomics and disease susceptibility, *Nat.Rev.Genet.* (Band 8), Nr. 4, Seite 253-262. URL: PM:17363974

Joffe, R. T. und Sokolov, S. T. (1994): Thyroid hormones, the brain, and affective disorders, *Crit Rev.Neurobiol.* (Band 8), Nr. 1-2, Seite 45-63. URL: PM:8124730

Johnson-Restrepo, B.; Adams, D. H. und Kannan, K. (2007): Tetrabromobisphenol A (TBBPA) and hexabromocyclododecanes (HBCDs) in tissues of humans, dolphins, and sharks from the United States, *Chemosphere*. URL: PM:18037156

Jones, K. E.; Brubaker, J. H. und Chin, W. W. (1994): Evidence that phosphorylation events participate in thyroid hormone action, *Endocrinology* (Band 134), Nr. 2, Seite 543-548. URL: PM:8299553

Jugan, M. L.; Levy-Bimbot, M.; Pomerance, M.; Tamisier-Karolak, S.; Blondeau, J. P. und Levi, Y. (2007): A new bioluminescent cellular assay to measure the transcriptional effects of chemicals that modulate the alpha-1 thyroid hormone receptor, *Toxicol.In Vitro*. URL: PM:17532181

Kamegai, J.; Tamura, H.; Ishii, S.; Sugihara, H. und Wakabayashi, I. (2001): Thyroid hormones regulate pituitary growth hormone secretagogue receptor gene expression, *J.Neuroendocrinol.* (Band 13), Nr. 3, Seite 275-278. URL: PM:11207942

Kang, J. H.; Kondo, F. und Katayama, Y. (2006): Human exposure to bisphenol A, *Toxicology* (Band 226), Nr. 2-3, Seite 79-89. URL: PM:16860916

Katz, R. W. und König, R. J. (1994): Specificity and mechanism of thyroid hormone induction from an octamer response element, *J.Biol.Chem.* (Band 269), Nr. 29, Seite 18915-18920. URL: PM:8034648

Katz, R. W. und König, R. J. (1993): Nonbiased identification of DNA sequences that bind thyroid hormone receptor alpha 1 with high affinity, *J.Biol.Chem.* (Band 268), Nr. 26, Seite 19392-19397. URL: PM:8366086

Kester, M. H.; Kuiper, G. G.; Versteeg, R. und Visser, T. J. (2006): Regulation of type III iodothyronine deiodinase expression in human cell lines, *Endocrinology* (Band 147), Nr. 12, Seite 5845-5854. URL: PM:16935842

Khan, M. A.; Lichtensteiger, C. A.; Faroon, O.; Mumtaz, M.; Schaeffer, D. J. und Hansen, L. G. (2002): The hypothalamo-pituitary-thyroid (HPT) axis: a target of nonpersistent ortho-substituted PCB congeners, *Toxicol.Sci.* (Band 65), Nr. 1, Seite 52-61. URL: PM:11752685

Kishimoto, M.; Fujiki, R.; Takezawa, S.; Sasaki, Y.; Nakamura, T.; Yamaoka, K.; Kitagawa, H. und Kato, S. (2006): Nuclear receptor mediated gene regulation through chromatin remodeling and histone modifications, *Endocr.J.* (Band 53), Nr. 2, Seite 157-172. URL: PM:16618973

Kitamura, S.; Jinno, N.; Ohta, S.; Kuroki, H. und Fujimoto, N. (2002): Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (Band 293), Nr. 1, Seite 554-559. URL: PM:12054637

Kitamura, S.; Kato, T.; Iida, M.; Jinno, N.; Suzuki, T.; Ohta, S.; Fujimoto, N.; Hanada, H.; Kashiwagi, K. und Kashiwagi, A. (2005): Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis, *Life Sci.* (Band 76), Nr. 14, Seite 1589-1601. URL: PM:15680168

Klammer, H.; Schlecht, C.; Wuttke, W.; Schmutzler, C.; Gotthardt, I.; Kohrle, J. und Jarry, H. (2007): Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary-thyroid function in rats, *Toxicology*. URL: PM:17651886

Klein, I. und Ojamaa, K. (2001): Thyroid hormone and the cardiovascular system, *N.Engl.J.Med.* (Band 344), Nr. 7, Seite 501-509. URL: PM:11172193

Kloas, W. (2002): Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors, *Int.Rev.Cytol.* (Band 216), Seite 1-57. URL: PM:12049206

Kloas, W. und Lutz, I. (2006): Amphibians as model to study endocrine disruptors, *J.Chromatogr.A.* URL: PM:16701677

Köhrle, J. (2007): Thyroid hormone transporters in health and disease: advances in thyroid hormone deiodination, *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab* (Band 21), Nr. 2, Seite 173-191. URL: PM:17574002

Köhrle, J. (2000): The selenoenzyme family of deiodinase isozymes controls local thyroid hormone availability, *Rev.Endocr.Metab Disord.* (Band 1), Nr. 1-2, Seite 49-58. URL: PM:11704992

Köhrle, J.; Auf'mkolk, M.; Rokos, H.; Hesch, R. D. und Cody, V. (1986): Rat liver iodothyronine monodeiodinase. Evaluation of the iodothyronine ligand-binding site, *J.Biol.Chem.* (Band 261), Nr. 25, Seite 11613-11622. URL: PM:3745159

Köhrle, J.; Fang, S. L.; Yang, Y.; Irmischer, K.; Hesch, R. D.; Pino, S.; Alex, S. und Braverman, L. E. (1989): Rapid effects of the flavonoid EMD 21388 on serum thyroid hormone binding and thyrotropin regulation in the rat, *Endocrinology* (Band 125), Nr. 1, Seite 532-537. URL: PM:2737161

- Köhrle, J.; Spanka, M.; Irmischer, K. und Hesch, R. D. (1988): Flavonoid effects on transport, metabolism and action of thyroid hormones, *Prog.Clin.Biol.Res.* (Band 280), Seite 323-340. URL: PM:3140249
- Kollmus, H.; Flohe, L. und McCarthy, J. E. (1996): Analysis of eukaryotic mRNA structures directing cotranslational incorporation of selenocysteine, *Nucleic Acids Res.* (Band 24), Nr. 7, Seite 1195-1201. URL: PM:8614619
- König, R. J. (2005): Regulation of type 1 iodothyronine deiodinase in health and disease, *Thyroid* (Band 15), Nr. 8, Seite 835-840. URL: PM:16131326
- Krishnan, A. V.; Stathis, P.; Permuth, S. F.; Tokes, L. und Feldman, D. (1993): Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving, *Endocrinology* (Band 132), Nr. 6, Seite 2279-2286. URL: PM:8504731
- Kroll, D. J.; Shaw, H. S. und Oberlies, N. H. (2007): Milk thistle nomenclature: why it matters in cancer research and pharmacokinetic studies, *Integr.Cancer Ther.* (Band 6), Nr. 2, Seite 110-119. URL: PM:17548790
- Kudo, Y.; Yamauchi, K.; Fukazawa, H. und Terao, Y. (2006): In Vitro and In Vivo Analysis of the Thyroid System-Disrupting Activities of Brominated Phenolic and Phenol Compounds in *Xenopus laevis*, *Toxicol.Sci.* URL: PM:16627555
- Kuno-Murata, M.; Koibuchi, N.; Fukuda, H.; Murata, M. und Chin, W. W. (2000): Augmentation of thyroid hormone receptor-mediated transcription by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase type IV, *Endocrinology* (Band 141), Nr. 6, Seite 2275-2278. URL: PM:10830318
- Kuriyama, S. N.; Talsness, C. E.; Grote, K. und Chahoud, I. (2005): Developmental exposure to low dose PBDE 99: effects on male fertility and neurobehavior in rat offspring, *Environ.Health Perspect.* (Band 113), Nr. 2, Seite 149-154. URL: PM:15687051
- Kurokawa, R.; Yu, V. C.; Naar, A.; Kyakumoto, S.; Han, Z.; Silverman, S.; Rosenfeld, M. G. und Glass, C. K. (1993): Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxy-terminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers, *Genes Dev.* (Band 7), Nr. 7B, Seite 1423-1435. URL: PM:8392479
- Lambright, C.; Ostby, J.; Bobseine, K.; Wilson, V.; Hotchkiss, A. K.; Mann, P. C. und Gray, L. E., Jr. (2000): Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats, *Toxicol.Sci.* (Band 56), Nr. 2, Seite 389-399. URL: PM:10910998
- Lancon, A.; Hanet, N.; Jannin, B.; Delmas, D.; Heydel, J. M.; Lizard, G.; Chagnon, M. C.; Artur, Y. und Latruffe, N. (2007): Resveratrol in human hepatoma HepG2 cells: metabolism and inducibility of detoxifying enzymes, *Drug Metab Dispos.* (Band 35), Nr. 5, Seite 699-703. URL: PM:17287390
- Lanni, A.; Moreno, M.; Cioffi, M. und Goglia, F. (1992): Effect of 3,3'-diiodothyronine and 3,5-diiodothyronine on rat liver oxidative capacity, *Mol.Cell Endocrinol.* (Band 86), Nr. 3, Seite 143-148. URL: PM:1324858
- Lanni, A.; Moreno, M.; Cioffi, M. und Goglia, F. (1993): Effect of 3,3'-di-iodothyronine and 3,5-di-iodothyronine on rat liver mitochondria, *J.Endocrinol.* (Band 136), Nr. 1, Seite 59-64. URL: PM:8381457

- Lanni, A.; Moreno, M.; Lombardi, A.; de Lange, P. und Goglia, F. (2001): Control of energy metabolism by iodothyronines, *J.Endocrinol.Invest* (Band 24), Nr. 11, Seite 897-913. URL: PM:11817716
- Lanni, A.; Moreno, M.; Lombardi, A. und Goglia, F. (2003): Thyroid hormone and uncoupling proteins, *FEBS Lett.* (Band 543), Nr. 1-3, Seite 5-10. URL: PM:12753895
- Lanni, A.; Moreno, M.; Lombardi, A. und Goglia, F. (1994): Rapid stimulation in vitro of rat liver cytochrome oxidase activity by 3,5-diiodo-L-thyronine and by 3,3'-diiodo-L-thyronine, *Mol.Cell Endocrinol.* (Band 99), Nr. 1, Seite 89-94. URL: PM:8187965
- Latruffe, N.; Delmas, D.; Jannin, B.; Cherkaoui, Malki M.; Passilly-Degrace, P. und Berlot, J. P. (2002): Molecular analysis on the chemopreventive properties of resveratrol, a plant polyphenol microcomponent, *Int.J.Mol.Med.* (Band 10), Nr. 6, Seite 755-760. URL: PM:12430003
- Lazar, M. A. (1993): Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities, *Endocr.Rev.* (Band 14), Nr. 2, Seite 184-193. URL: PM:8325251
- Lee, J. I.; Narayan, M. und Barrett, J. S. (2007): Analysis and comparison of active constituents in commercial standardized silymarin extracts by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry, *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* (Band 845), Nr. 1, Seite 95-103. URL: PM:16942922
- Leng, X.; Blanco, J.; Tsai, S. Y.; Ozato, K.; O'Malley, B. W. und Tsai, M. J. (1994): Mechanisms for synergistic activation of thyroid hormone receptor and retinoid X receptor on different response elements, *J.Biol.Chem.* (Band 269), Nr. 50, Seite 31436-31442. URL: PM:7989311
- Lim, W.; Nguyen, N. H.; Yang, H. Y.; Scanlan, T. S. und Furlow, J. D. (2002): A thyroid hormone antagonist that inhibits thyroid hormone action in vivo, *J.Biol.Chem.* (Band 277), Nr. 38, Seite 35664-35670. URL: PM:12095994
- Lin, H. Y.; Hopkins, R.; Cao, H. J.; Tang, H. Y.; Alexander, C.; Davis, F. B. und Davis, P. J. (2005): Acetylation of nuclear hormone receptor superfamily members: thyroid hormone causes acetylation of its own receptor by a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism, *Steroids* (Band 70), Nr. 5-7, Seite 444-449. URL: PM:15862828
- Lin, H. Y.; Tang, H. Y.; Keating, T.; Wu, Y. H.; Shih, A.; Hammond, D.; Sun, M.; Hercbergs, A.; Davis, F. B. und Davis, P. J. (2007a): RESVERATROL IS PRO-APOPTOTIC AND THYROID HORMONE IS ANTI-APOPTOTIC IN GLIOMA CELLS: BOTH ACTIONS ARE INTE, *Carcinogenesis*. URL: PM:17984113
- Lin, H. Y.; Tang, H. Y.; Shih, A.; Keating, T.; Cao, G.; Davis, P. J. und Davis, F. B. (2007b): Thyroid hormone is a MAPK-dependent growth factor for thyroid cancer cells and is anti-apoptotic, *Steroids* (Band 72), Nr. 2, Seite 180-187. URL: PM:17174366
- Lin, H. Y.; Zhang, S.; West, B. L.; Tang, H. Y.; Passaretti, T.; Davis, F. B. und Davis, P. J. (2003): Identification of the putative MAP kinase docking site in the thyroid hormone receptor-beta1 DNA-binding domain: functional consequences of mutations at the docking site, *Biochemistry* (Band 42), Nr. 24, Seite 7571-7579. URL: PM:12809513
- Lombardi, A.; Lanni, A.; Moreno, M.; Brand, M. D. und Goglia, F. (1998): Effect of 3,5-di-iodo-L-thyronine on the mitochondrial energy-transduction apparatus, *Biochem.J.* (Band 330 ( Pt 1)), Seite 521-526. URL: PM:9461551

- Lu, Y. Y.; Chen, M. L.; Sung, F. C.; Wang, P. S. und Mao, I. F. (2007): Daily intake of 4-nonylphenol in Taiwanese, *Environ.Int.* (Band 33), Nr. 7, Seite 903-910. URL: PM:17512594
- Maerkel, K.; Durrer, S.; Henseler, M.; Schlumpf, M. und Lichtensteiger, W. (2007): Sexually dimorphic gene regulation in brain as a target for endocrine disruptors: developmental exposure of rats to 4-methylbenzylidene camphor, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* (Band 218), Nr. 2, Seite 152-165. URL: PM:17188730
- Mahajan, M. A. und Samuels, H. H. (2005): Nuclear hormone receptor coregulator: role in hormone action, metabolism, growth, and development, *Endocr.Rev.* (Band 26), Nr. 4, Seite 583-597. URL: PM:15561801
- Makihira, S.; Yan, W.; Murakami, H.; Furukawa, M.; Kawai, T.; Nikawa, H.; Yoshida, E.; Hamada, T.; Okada, Y. und Kato, Y. (2003): Thyroid hormone enhances aggrecanase-2/ADAM-TS5 expression and proteoglycan degradation in growth plate cartilage, *Endocrinology* (Band 144), Nr. 6, Seite 2480-2488. URL: PM:12746310
- Malm, J.; Grover, G. J. und Farnegardh, M. (2007): Recent advances in the development of agonists selective for beta1-type thyroid hormone receptor, *Mini.Rev.Med.Chem.* (Band 7), Nr. 1, Seite 79-86. URL: PM:17266640
- Mandel, L. R. und Kuehl, F. A., Jr. (1967): Lipolytic action of 3,3',5-triiodo-L-thyronine, a cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* (Band 28), Nr. 1, Seite 13-18. URL: PM:4292872
- Mangelsdorf, D. J.; Thummel, C.; Beato, M.; Herrlich, P.; Schutz, G.; Umesono, K.; Blumberg, B.; Kastner, P.; Mark, M.; Chambon, P. und Evans, R. M. (1995): The nuclear receptor superfamily: the second decade, *Cell* (Band 83), Nr. 6, Seite 835-839. URL: PM:8521507
- Manson, J. M. (1986): Mechanism of nitrofen teratogenesis, *Environ.Health Perspect.* (Band 70), Seite 137-147. URL: PM:3830099
- Manson, J. M.; Brown, T. und Baldwin, D. M. (1984): Teratogenicity of nitrofen (2,4-dichloro-4'-nitrodiphenyl ether) and its effects on thyroid function in the rat, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* (Band 73), Nr. 2, Seite 323-335. URL: PM:6710532
- Marimuthu, A.; Feng, W.; Tagami, T.; Nguyen, H.; Jameson, J. L.; Fletterick, R. J.; Baxter, J. D. und West, B. L. (2002): TR surfaces and conformations required to bind nuclear receptor corepressor, *Mol.Endocrinol.* (Band 16), Nr. 2, Seite 271-286. URL: PM:11818500
- McKenna, N. J. und O'Malley, B. W. (2002): Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators, *Cell* (Band 108), Nr. 4, Seite 465-474. URL: PM:11909518
- McLachlan, J. A. (2001): Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals, *Endocr.Rev.* (Band 22), Nr. 3, Seite 319-341. URL: PM:11399747
- McLachlan, J. A.; Newbold, R. R. und Bullock, B. (1975): Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol, *Science* (Band 190), Nr. 4218, Seite 991-992. URL: PM:242076
- McNabb, F. M. (2006): Avian thyroid development and adaptive plasticity, *Gen.Comp Endocrinol.* (Band 147), Nr. 2, Seite 93-101. URL: PM:16457824



- Meerts, I. A.; van Zanden, J. J.; Luijckx, E. A.; Leeuwen-Bol, I.; Marsh, G.; Jakobsson, E.; Bergman, A. und Brouwer, A. (2000): Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro, *Toxicol.Sci.* (Band 56), Nr. 1, Seite 95-104. URL: PM:10869457
- Mendel, C. M. (1992): The free hormone hypothesis. Distinction from the free hormone transport hypothesis, *J.Androl* (Band 13), Nr. 2, Seite 107-116. URL: PM:1597394
- Mennen, L. I.; Walker, R.; Bennetau-Pelissero, C. und Scalbert, A. (2005): Risks and safety of polyphenol consumption, *Am.J.Clin.Nutr.* (Band 81), Nr. 1, Seite 326S-329S. URL: PM:15640498
- Meyer, T. und Hesch, R. D. (1983): Triiodothyronamine--a beta-adrenergic metabolite of triiodothyronine?, *Horm.Metab Res.* (Band 15), Nr. 12, Seite 602-606. URL: PM:6319258
- Miller, L. D.; McPhie, P.; Suzuki, H.; Kato, Y.; Liu, E. T. und Cheng, S. Y. (2004): Multi-tissue gene-expression analysis in a mouse model of thyroid hormone resistance, *Genome Biol.* (Band 5), Nr. 5, Seite R31. URL: PM:15128445
- Miller, L. D.; Park, K. S.; Guo, Q. M.; Alkharouf, N. W.; Malek, R. L.; Lee, N. H.; Liu, E. T. und Cheng, S. Y. (2001): Silencing of Wnt signaling and activation of multiple metabolic pathways in response to thyroid hormone-stimulated cell proliferation, *Mol.Cell Biol.* (Band 21), Nr. 19, Seite 6626-6639. URL: PM:11533250
- Mitro, N.; Mak, P. A.; Vargas, L.; Godio, C.; Hampton, E.; Molteni, V.; Kreusch, A. und Saez, E. (2007): The nuclear receptor LXR is a glucose sensor, *Nature* (Band 445), Nr. 7124, Seite 219-223. URL: PM:17187055
- Mitsuhashi, T.; Tennyson, G. E. und Nikodem, V. M. (1988): Alternative splicing generates messages encoding rat c-erbA proteins that do not bind thyroid hormone, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 85), Nr. 16, Seite 5804-5808. URL: PM:2901090
- Miura, M.; Tanaka, K.; Komatsu, Y.; Suda, M.; Yasoda, A.; Sakuma, Y.; Ozasa, A. und Nakao, K. (2002): Thyroid hormones promote chondrocyte differentiation in mouse ATDC5 cells and stimulate endochondral ossification in fetal mouse tibias through iodothyronine deiodinases in the growth plate, *J.Bone Miner.Res.* (Band 17), Nr. 3, Seite 443-454. URL: PM:11874236
- Moeller, L. C.; Cao, X.; Dumitrescu, A. M.; Seo, H. und Refetoff, S. (2006): Thyroid hormone mediated changes in gene expression can be initiated by cytosolic action of the thyroid hormone receptor beta through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway, *Nucl.Recept.Signal.* (Band 4), Seite e020. URL: PM:16862226
- Morita, M.; Kobayashi, A.; Yamashita, T.; Shimanuki, T.; Nakajima, O.; Takahashi, S.; Ikegami, S.; Inokuchi, K.; Yamashita, K.; Yamamoto, M. und Fujii-Kuriyama, Y. (2003): Functional analysis of basic transcription element binding protein by gene targeting technology, *Mol.Cell Biol.* (Band 23), Nr. 7, Seite 2489-2500. URL: PM:12640131
- Moriyama, K.; Tagami, T.; Akamizu, T.; Usui, T.; Saijo, M.; Kanamoto, N.; Hataya, Y.; Shimatsu, A.; Kuzuya, H. und Nakao, K. (2002): Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist, *J.Clin.Endocrinol.Metab* (Band 87), Nr. 11, Seite 5185-5190. URL: PM:12414890
- Munoz, A.; Wrighton, C.; Seliger, B.; Bernal, J. und Beug, H. (1993): Thyroid hormone receptor/c-erbA: control of commitment and differentiation in the neuronal/chromaffin progenitor line PC12, *J.Cell Biol.* (Band 121), Nr. 2, Seite 423-438. URL: PM:8385673

- Munoz, A.; Zenke, M.; Gehring, U.; Sap, J.; Beug, H. und Vennstrom, B. (1988): Characterization of the hormone-binding domain of the chicken c-erbA/thyroid hormone receptor protein, *EMBO J.* (Band 7), Nr. 1, Seite 155-159. URL: PM:3359993
- Murray, M. B.; Zilz, N. D.; McCreary, N. L.; MacDonald, M. J. und Towle, H. C. (1988): Isolation and characterization of rat cDNA clones for two distinct thyroid hormone receptors, *J.Biol.Chem.* (Band 263), Nr. 25, Seite 12770-12777. URL: PM:2457590
- Nagel, S. C.; vom Saal, F. S. und Welshons, W. V. (1999): Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an in vitro assay incorporating modification of cell uptake by serum, *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* (Band 69), Nr. 1-6, Seite 343-357. URL: PM:10419012
- Nagy, L.; Kao, H. Y.; Love, J. D.; Li, C.; Banayo, E.; Gooch, J. T.; Krishna, V.; Chatterjee, K.; Evans, R. M. und Schwabe, J. W. (1999): Mechanism of corepressor binding and release from nuclear hormone receptors, *Genes Dev.* (Band 13), Nr. 24, Seite 3209-3216. URL: PM:10617570
- Ness, G. C.; Lopez, D.; Chambers, C. M.; Newsome, W. P.; Cornelius, P.; Long, C. A. und Harwood, H. J., Jr. (1998): Effects of L-triiodothyronine and the thyromimetic L-94901 on serum lipoprotein levels and hepatic low-density lipoprotein receptor, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, and apo A-I gene expression, *Biochem.Pharmacol.* (Band 56), Nr. 1, Seite 121-129. URL: PM:9698096
- New, D. C.; Miller-Martini, D. M. und Wong, Y. H. (2003): Reporter gene assays and their applications to bioassays of natural products, *Phytother.Res.* (Band 17), Nr. 5, Seite 439-448. URL: PM:12748976
- Nguyen, N. H.; Apriletti, J. W.; Baxter, J. D. und Scanlan, T. S. (2005): Hammett analysis of selective thyroid hormone receptor modulators reveals structural and electronic requirements for hormone antagonists, *J.Am.Chem.Soc.* (Band 127), Nr. 13, Seite 4599-4608. URL: PM:15796525
- Nguyen, N. H.; Apriletti, J. W.; Cunha Lima, S. T.; Webb, P.; Baxter, J. D. und Scanlan, T. S. (2002): Rational design and synthesis of a novel thyroid hormone antagonist that blocks coactivator recruitment, *J.Med.Chem.* (Band 45), Nr. 15, Seite 3310-3320. URL: PM:12109914
- Nicoloff, J. T.; Low, J. C.; Dussault, J. H. und Fisher, D. A. (1972): Simultaneous measurement of thyroxine and triiodothyronine peripheral turnover kinetics in man, *J.Clin.Invest* (Band 51), Nr. 3, Seite 473-483. URL: PM:4110897
- Nordeen, S. K.; Green, P. P., III und Fowlkes, D. M. (1987): A rapid, sensitive, and inexpensive assay for chloramphenicol acetyltransferase, *DNA* (Band 6), Nr. 2, Seite 173-178. URL: PM:3472867
- Nunes, F. M.; Aparicio, R.; Santos, M. A.; Portugal, R. V.; Dias, S. M.; Neves, F. A.; Simeoni, L. A.; Baxter, J. D.; Webb, P. und Polikarpov, I. (2004): Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of isoform alpha1 of the human thyroid hormone receptor ligand-binding domain, *Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.* (Band 60), Nr. Pt 10, Seite 1867-1870. URL: PM:15388935
- Nunez, J. (1984): Effects of thyroid hormones during brain differentiation, *Mol.Cell Endocrinol.* (Band 37), Nr. 2, Seite 125-132. URL: PM:6092169
- O'Shea, P. J.; Guigon, C. J.; Williams, G. R. und Cheng, S. Y. (2007): Regulation of Fibroblast Growth Factor Receptor-1 by Thyroid Hormone: Identification of a Thyroid

Hormone Response Element in the Murine Fgfr1 Promoter, *Endocrinology*. URL: PM:17761769

Oetting, A. und Yen, P. M. (2007): New insights into thyroid hormone action, *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab* (Band 21), Nr. 2, Seite 193-208. URL: PM:17574003

Olea, N.; Pulgar, R.; Perez, P.; Olea-Serrano, F.; Rivas, A.; Novillo-Fertrell, A.; Pedraza, V.; Soto, A. M. und Sonnenschein, C. (1996): Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry, *Environ.Health Perspect.* (Band 104), Nr. 3, Seite 298-305. URL: PM:8919768

Olson, J. M.; McNabb, F. M.; Jablonski, M. S. und Ferris, D. V. (1999): Thyroid development in relation to the development of endothermy in the red-winged blackbird (*Agelaius phoeniceus*), *Gen.Comp Endocrinol.* (Band 116), Nr. 2, Seite 204-212. URL: PM:10562450

Opitz, R.; Braunbeck, T.; Bogi, C.; Pickford, D. B.; Nentwig, G.; Oehlmann, J.; Tooi, O.; Lutz, I. und Kloas, W. (2005): Description and initial evaluation of a *Xenopus* metamorphosis assay for detection of thyroid system-disrupting activities of environmental compounds, *Environ.Toxicol.Chem.* (Band 24), Nr. 3, Seite 653-664. URL: PM:15779766

Opitz, R.; Hartmann, S.; Blank, T.; Braunbeck, T.; Lutz, I. und Kloas, W. (2006a): Evaluation of histological and molecular endpoints for enhanced detection of thyroid system disruption in *Xenopus laevis* tadpoles, *Toxicol.Sci.* (Band 90), Nr. 2, Seite 337-348. URL: PM:16396842

Opitz, R.; Lutz, I.; Nguyen, N. H.; Scanlan, T. S. und Kloas, W. (2006b): Analysis of thyroid hormone receptor betaA mRNA expression in *Xenopus laevis* tadpoles as a means to detect agonism and antagonism of thyroid hormone action, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* (Band 212), Nr. 1, Seite 1-13. URL: PM:16040072

Opitz, R.; Trubiroha, A.; Lorenz, C.; Lutz, I.; Hartmann, S.; Blank, T.; Braunbeck, T. und Kloas, W. (2006c): Expression of sodium-iodide symporter mRNA in the thyroid gland of *Xenopus laevis* tadpoles: developmental expression, effects of antithyroidal compounds, and regulation by TSH, *J.Endocrinol.* (Band 190), Nr. 1, Seite 157-170. URL: PM:16837620

Ortiga-Carvalho, T. M.; Shibusawa, N.; Nikrodhanond, A.; Oliveira, K. J.; Machado, D. S.; Liao, X. H.; Cohen, R. N.; Refetoff, S. und Wondisford, F. E. (2005): Negative regulation by thyroid hormone receptor requires an intact coactivator-binding surface, *J.Clin.Invest* (Band 115), Nr. 9, Seite 2517-2523. URL: PM:16100573

Otaka, H.; Yasuhara, A. und Morita, M. (2003): Determination of bisphenol A and 4-nonylphenol in human milk using alkaline digestion and cleanup by solid-phase extraction, *Anal.Sci.* (Band 19), Nr. 12, Seite 1663-1666. URL: PM:14696933

Papavasiliou, S. S.; Martial, J. A.; Latham, K. R. und Baxter, J. D. (1977): Thyroid hormonelike actions of 3,3',5'-L-triiodothyronine nad 3,3'-diiodothyronine, *J.Clin.Invest* (Band 60), Nr. 6, Seite 1230-1239. URL: PM:199617

Perlmann, T.; Rangarajan, P. N.; Umesono, K. und Evans, R. M. (1993): Determinants for selective RAR and TR recognition of direct repeat HREs, *Genes Dev.* (Band 7), Nr. 7B, Seite 1411-1422. URL: PM:8392478

- Poiger, T.; Buser, H. R.; Balmer, M. E.; Bergqvist, P. A. und Muller, M. D. (2004): Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes, *Chemosphere* (Band 55), Nr. 7, Seite 951-963. URL: PM:15051365
- Porterfield, S. P. und Hendry, L. B. (1998): Impact of PCBs on thyroid hormone directed brain development, *Toxicol.Ind.Health* (Band 14), Nr. 1-2, Seite 103-120. URL: PM:9460172
- Pradhan, S. C. und Girish, C. (2006): Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine, *Indian J.Med.Res.* (Band 124), Nr. 5, Seite 491-504. URL: PM:17213517
- Quack, M.; Frank, C. und Carlberg, C. (2002): Differential nuclear receptor signalling from DR4-type response elements, *J.Cell Biochem.* (Band 86), Nr. 3, Seite 601-612. URL: PM:12210766
- Quednow, K. und Puttmann, W. (2007): Endocrine disruptors in freshwater streams of Hesse, Germany: Changes in concentration levels in the time span from 2003 to 2005, *Environ.Pollut.* URL: PM:17698268
- Radovic, B.; Mentrup, B. und Kohrle, J. (2006): Genistein and other soya isoflavones are potent ligands for transthyretin in serum and cerebrospinal fluid, *Br.J.Nutr.* (Band 95), Nr. 6, Seite 1171-1176. URL: PM:16768841
- Radovic, B.; Schmutzler, C. und Kohrle, J. (2005): Xanthohumol stimulates iodide uptake in rat thyroid-derived FRTL-5 cells, *Mol.Nutr.Food Res.* (Band 49), Nr. 9, Seite 832-836. URL: PM:16092068
- Reijnders, P. J. (1986): Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters, *Nature* (Band 324), Nr. 6096, Seite 456-457. URL: PM:3785423
- Ribeiro, R. C.; Apriletti, J. W.; Wagner, R. L.; Feng, W.; Kushner, P. J.; Nilsson, S.; Scanlan, T. S.; West, B. L.; Fletterick, R. J. und Baxter, J. D. (1998): X-ray crystallographic and functional studies of thyroid hormone receptor, *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* (Band 65), Nr. 1-6, Seite 133-141. URL: PM:9699866
- Richardson, S. J. (2007): Cell and molecular biology of transthyretin and thyroid hormones, *Int.Rev.Cytol.* (Band 258), Seite 137-193. URL: PM:17338921
- Riesco-Eizaguirre, G. und Santisteban, P. (2006): A perspective view of sodium iodide symporter research and its clinical implications, *Eur.J.Endocrinol.* (Band 155), Nr. 4, Seite 495-512. URL: PM:16990649
- RIPP, J. A. (1961): Soybean-induced goiter, *Am.J.Dis.Child* (Band 102), Seite 106-109. URL: PM:13741810
- Roberts, R. J.; Belfort, M.; Bestor, T.; Bhagwat, A. S.; Bickle, T. A.; Bitinaite, J.; Blumenthal, R. M.; Degtyarev, S. K.; Dryden, D. T.; Dybvig, K.; Firman, K.; Gromova, E. S.; Gumpert, R. I.; Halford, S. E.; Hattman, S.; Heitman, J.; Hornby, D. P.; Janulaitis, A.; Jeltsch, A.; Josephsen, J.; Kiss, A.; Klaenhammer, T. R.; Kobayashi, I.; Kong, H.; Kruger, D. H.; Lacks, S.; Marinus, M. G.; Miyahara, M.; Morgan, R. D.; Murray, N. E.; Nagaraja, V.; Piekarowicz, A.; Pingoud, A.; Raleigh, E.; Rao, D. N.; Reich, N.; Repin, V. E.; Selker, E. U.; Shaw, P. C.; Stein, D. C.; Stoddard, B. L.; Szybalski, W.; Trautner, T. A.; Van Etten, J. L.; Vitor, J. M.; Wilson, G. G. und Xu, S. Y. (2003): A nomenclature

for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes, *Nucleic Acids Res.* (Band 31), Nr. 7, Seite 1805-1812. URL: PM:12654995

Rosenfeld, M. G.; Lunyak, V. V. und Glass, C. K. (2006): Sensors and signals: a coactivator/corepressor/epigenetic code for integrating signal-dependent programs of transcriptional response, *Genes Dev.* (Band 20), Nr. 11, Seite 1405-1428. URL: PM:16751179

Safe, S. H. (2000): Endocrine disruptors and human health--is there a problem? An update, *Environ.Health Perspect.* (Band 108), Nr. 6, Seite 487-493. URL: PM:10856020

Saiko, P.; Szakmary, A.; Jaeger, W. und Szekeres, T. (2007): Resveratrol and its analogs: Defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?, *Mutat.Res.* URL: PM:17890139

Sambrook, J. und Russel, D. W. (2001): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Band 1-3), Third Edition. Auflage, ISBN: 0879695773.

Sap, J.; Munoz, A.; Damm, K.; Goldberg, Y.; Ghysdael, J.; Leutz, A.; Beug, H. und Vennstrom, B. (1986): The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone, *Nature* (Band 324), Nr. 6098, Seite 635-640. URL: PM:2879242

Sato, M.; Maulik, N. und Das, D. K. (2002): Cardioprotection with alcohol: role of both alcohol and polyphenolic antioxidants, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (Band 957), Seite 122-135. URL: PM:12074967

Schauer, U. M.; Volkel, W.; Heusener, A.; Colnot, T.; Broschard, T. H.; von, Landenberg F. und Dekant, W. (2006): Kinetics of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in rats and humans after dermal application, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* (Band 216), Nr. 2, Seite 339-346. URL: PM:16814339

Schlumpf, M.; Cotton, B.; Conscience, M.; Haller, V.; Steinmann, B. und Lichtensteiger, W. (2001): In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens, *Environ.Health Perspect.* (Band 109), Nr. 3, Seite 239-244. URL: PM:11333184

Schlumpf, M.; Jarry, H.; Wuttke, W.; Ma, R. und Lichtensteiger, W. (2004a): Estrogenic activity and estrogen receptor beta binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor, *Toxicology* (Band 199), Nr. 2-3, Seite 109-120. URL: PM:15147785

Schlumpf, M.; Schmid, P.; Durrer, S.; Conscience, M.; Maerker, K.; Henseler, M.; Gruetter, M.; Herzog, I.; Reolon, S.; Ceccatelli, R.; Faass, O.; Stutz, E.; Jarry, H.; Wuttke, W. und Lichtensteiger, W. (2004b): Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters--an update, *Toxicology* (Band 205), Nr. 1-2, Seite 113-122. URL: PM:15458796

Schmutzler, C.; Bacinski, A.; Gotthardt, I.; Huhne, K.; Ambrugger, P.; Klammer, H.; Schlecht, C.; Hoang-Vu, C.; Gruters, A.; Wuttke, W.; Jarry, H. und Kohrle, J. (2007): The UV filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase, *Endocrinology*. URL: PM:17379648

Schmutzler, C.; Hamann, I.; Hofmann, P. J.; Kovacs, G.; Stemmler, L.; Mentrup, B.; Schomburg, L.; Ambrugger, P.; Gruters, A.; Seidlova-Wuttke, D.; Jarry, H.; Wuttke, W. und Kohrle, J. (2004): Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid

hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney, *Toxicology* (Band 205), Nr. 1-2, Seite 95-102. URL: PM:15458794

Schönfelder, G.; Flick, B.; Mayr, E.; Talsness, C.; Paul, M. und Chahoud, I. (2002a): In utero exposure to low doses of bisphenol A lead to long-term deleterious effects in the vagina, *Neoplasia*. (Band 4), Nr. 2, Seite 98-102. URL: PM:11896564

Schönfelder, G.; Wittfoht, W.; Hopp, H.; Talsness, C. E.; Paul, M. und Chahoud, I. (2002b): Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit, *Environ.Health Perspect.* (Band 110), Nr. 11, Seite A703-A707. URL: PM:12417499

Schröder-van der Elst JP; Smit, J. W.; Romijn, H. A. und van der, Heide D. (2003): Dietary flavonoids and iodine metabolism, *Biofactors* (Band 19), Nr. 3-4, Seite 171-176. URL: PM:14757968

Schröder-van der Elst JP; van der, Heide D.; Romijn, J. A. und Smit, J. W. (2004): Differential effects of natural flavonoids on growth and iodide content in a human Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter-transfected follicular thyroid carcinoma cell line, *Eur.J.Endocrinol.* (Band 150), Nr. 4, Seite 557-564. URL: PM:15080787

Schwartz, H. L.; Strait, K. A.; Ling, N. C. und Oppenheimer, J. H. (1992): Quantitation of rat tissue thyroid hormone binding receptor isoforms by immunoprecipitation of nuclear triiodothyronine binding capacity, *J.Biol.Chem.* (Band 267), Nr. 17, Seite 11794-11799. URL: PM:1601852

Scribner, E. A.; Battaglin, W. A.; Goolsby, D. A. und Thurman, E. M. (2000): Changes in herbicide concentrations in Midwestern streams in relation to changes in use, 1989-1998, *Sci.Total Environ.* (Band 248), Nr. 2-3, Seite 255-263. URL: PM:10805244

Seidlova-Wuttke, D.; Jarry, H.; Christoffel, J.; Rimoldi, G. und Wuttke, W. (2005): Effects of bisphenol-A (BPA), dibutylphthalate (DBP), benzophenone-2 (BP2), procymidone (Proc), and linurone (Lin) on fat tissue, a variety of hormones and metabolic parameters: A 3 months comparison with effects of estradiol (E2) in ovariectomized (ovx) rats, *Toxicology*. URL: PM:15951094

Setchell, K. D.; Zimmer-Nechemias, L.; Cai, J. und Heubi, J. E. (1998): Isoflavone content of infant formulas and the metabolic fate of these phytoestrogens in early life, *Am.J.Clin.Nutr.* (Band 68), Nr. 6 Suppl, Seite 1453S-1461S. URL: PM:9848516

Shao, Y. Y.; Wang, L. und Ballock, R. T. (2006): Thyroid hormone and the growth plate, *Rev.Endocr.Metab Disord.* (Band 7), Nr. 4, Seite 265-271. URL: PM:17200892

Shi, Y.; Ye, H.; Link, K. H.; Putnam, M. C.; Hubner, I.; Dowdell, S. und Koh, J. T. (2005): Mutant-selective thyromimetics for the chemical rescue of thyroid hormone receptor mutants associated with resistance to thyroid hormone, *Biochemistry* (Band 44), Nr. 12, Seite 4612-4626. URL: PM:15779888

Siddiqi, M. A.; Laessig, R. H. und Reed, K. D. (2003): Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): new pollutants-old diseases, *Clin.Med.Res.* (Band 1), Nr. 4, Seite 281-290. URL: PM:15931321

Skinner, M. K. (2007): Endocrine Disruptors and Epigenetic Transgenerational Disease Etiology, *Pediatr.Res.* URL: PM:17413841

Smith, H. C.; Robinson, S. E. und Eastman, C. J. (1980): Binding of reverse T3 to hepatic nuclear protein, *Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci.* (Band 58), Nr. 2, Seite 207-212. URL: PM:7436879

Stervbo, U.; Vang, O. und Bonnesen, C. (2006): Time- and concentration-dependent effects of resveratrol in HL-60 and HepG2 cells, *Cell Prolif.* (Band 39), Nr. 6, Seite 479-493. URL: PM:17109633

Stevens, D. A.; Harvey, C. B.; Scott, A. J.; O'Shea, P. J.; Barnard, J. C.; Williams, A. J.; Brady, G.; Samarut, J.; Chassande, O. und Williams, G. R. (2003): Thyroid hormone activates fibroblast growth factor receptor-1 in bone, *Mol.Endocrinol.* (Band 17), Nr. 9, Seite 1751-1766. URL: PM:12805413

Stevens, J. F. und Page, J. E. (2004): Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health!, *Phytochemistry* (Band 65), Nr. 10, Seite 1317-1330. URL: PM:15231405

Storey, N. M.; Gentile, S.; Ullah, H.; Russo, A.; Muessel, M.; Erxleben, C. und Armstrong, D. L. (2006): Rapid signaling at the plasma membrane by a nuclear receptor for thyroid hormone, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 103), Nr. 13, Seite 5197-5201. URL: PM:16549781

Strack, S.; Detzel, T.; Wahl, M.; Kuch, B. und Krug, H. F. (2007): Cytotoxicity of TBBPA and effects on proliferation, cell cycle and MAPK pathways in mammalian cells, *Chemosphere* (Band 67), Nr. 9, Seite S405-S411. URL: PM:17254629

Suda, A. K.; Pittman, C. S.; Shimizu, T. und Chambers, J. B., Jr. (1978): The production and metabolism of 3,5,3'-triiodothyronine and 3,3',5-triiodothyronine in normal and fasting subjects, *J.Clin.Endocrinol.Metab* (Band 47), Nr. 6, Seite 1311-1319. URL: PM:263351

Suggs, S. V.; Wallace, R. B.; Hirose, T.; Kawashima, E. H. und Itakura, K. (1981): Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences for human beta 2-microglobulin, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 78), Nr. 11, Seite 6613-6617. URL: PM:6171820

Sumpter, J. P. (1995): Feminized responses in fish to environmental estrogens, *Toxicol.Lett.* (Band 82-83), Seite 737-742. URL: PM:8597136

Sun, Y.; Irie, M.; Kishikawa, N.; Wada, M.; Kuroda, N. und Nakashima, K. (2004): Determination of bisphenol A in human breast milk by HPLC with column-switching and fluorescence detection, *Biomed.Chromatogr.* (Band 18), Nr. 8, Seite 501-507. URL: PM:15386523

Talsness, C. E.; Shakibaei, M.; Kuriyama, S. N.; Grande, S. W.; Sterner-Kock, A.; Schnitker, P.; de, Souza C.; Grote, K. und Chahoud, I. (2005): Ultrastructural changes observed in rat ovaries following in utero and lactational exposure to low doses of a polybrominated flame retardant, *Toxicol.Lett.* (Band 157), Nr. 3, Seite 189-202. URL: PM:15917144

Tan, S. W. und Zoeller, R. T. (2007): Integrating basic research on thyroid hormone action into screening and testing programs for thyroid disruptors, *Crit Rev.Toxicol.* (Band 37), Nr. 1-2, Seite 5-10. URL: PM:17364703

Tasset, D.; Tora, L.; Fromental, C.; Scheer, E. und Chambon, P. (1990): Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms, *Cell* (Band 62), Nr. 6, Seite 1177-1187. URL: PM:2205398

Tata, J. R. (2006): Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone, *Mol.Cell Endocrinol.* (Band 246), Nr. 1-2, Seite 10-20. URL: PM:16413959

Thompson, C. C. (1996): Thyroid hormone-responsive genes in developing cerebellum include a novel synaptotagmin and a hairless homolog, *J.Neurosci.* (Band 16), Nr. 24, Seite 7832-7840. URL: PM:8987811

Thompson, C. C. und Evans, R. M. (1989): Trans-activation by thyroid hormone receptors: functional parallels with steroid hormone receptors, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 86), Nr. 10, Seite 3494-3498. URL: PM:2726731

Thompson, C. C.; Weinberger, C.; Lebo, R. und Evans, R. M. (1987): Identification of a novel thyroid hormone receptor expressed in the mammalian central nervous system, *Science* (Band 237), Nr. 4822, Seite 1610-1614. URL: PM:3629259

Thomsen, C.; Janak, K.; Lundanes, E. und Becher, G. (2001): Determination of phenolic flame-retardants in human plasma using solid-phase extraction and gas chromatography-electron-capture mass spectrometry, *J.Chromatogr.B Biomed.Sci.Appl.* (Band 750), Nr. 1, Seite 1-11. URL: PM:11204209

Toppari, J. (2002): Environmental endocrine disrupters and disorders of sexual differentiation, *Semin.Reprod.Med.* (Band 20), Nr. 3, Seite 305-312. URL: PM:12428210

Toppari, J.; Haavisto, A. M. und Alanen, M. (2002): Changes in male reproductive health and effects of endocrine disruptors in Scandinavian countries, *Cad.Saude Publica* (Band 18), Nr. 2, Seite 413-420. URL: PM:11923882

Trost, S. U.; Swanson, E.; Gloss, B.; Wang-Iverson, D. B.; Zhang, H.; Volodarsky, T.; Grover, G. J.; Baxter, J. D.; Chiellini, G.; Scanlan, T. S. und Dillmann, W. H. (2000): The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity, *Endocrinology* (Band 141), Nr. 9, Seite 3057-3064. URL: PM:10965874

Tuohy, P. G. (2003): Soy infant formula and phytoestrogens, *J.Paediatr.Child Health* (Band 39), Nr. 6, Seite 401-405. URL: PM:12919490

Umesono, K.; Murakami, K. K.; Thompson, C. C. und Evans, R. M. (1991): Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D3 receptors, *Cell* (Band 65), Nr. 7, Seite 1255-1266. URL: PM:1648450

van Rooij, E.; Sutherland, L. B.; Qi, X.; Richardson, J. A.; Hill, J. und Olson, E. N. (2007): Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA, *Science* (Band 316), Nr. 5824, Seite 575-579. URL: PM:17379774

Van Wyk, J. J.; Arnold, M. B.; Wynn, J. und Pepper, F. (1959): The effects of a soybean product on thyroid function in humans, *Pediatrics* (Band 24), Seite 752-760. URL: PM:13841160

Vandenberg, L. N.; Maffini, M. V.; Wadia, P. R.; Sonnenschein, C.; Rubin, B. S. und Soto, A. M. (2007): Exposure to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol-A alters development of the fetal mouse mammary gland, *Endocrinology* (Band 148), Nr. 1, Seite 116-127. URL: PM:17023525

Velasco, L. F.; Togashi, M.; Walfish, P. G.; Pessanha, R. P.; Moura, F. N.; Barra, G. B.; Nguyen, P.; Rebong, R.; Yuan, C.; Simeoni, L. A.; Ribeiro, R. C.; Baxter, J. D.; Webb, P. und Neves, F. A. (2007): Thyroid hormone response element organization dictates the composition of active receptor, *J.Biol.Chem.* (Band 282), Nr. 17, Seite 12458-12466. URL: PM:17311926



Veldhoen, N.; Boggs, A.; Walzak, K. und Helbing, C. C. (2006): Exposure to tetrabromobisphenol-A alters TH-associated gene expression and tadpole metamorphosis in the Pacific tree frog *Pseudacris regilla*, *Aquat.Toxicol.* (Band 78), Nr. 3, Seite 292-302. URL: PM:16678281

Visser, W. E.; Friesema, E. C.; Jansen, J. und Visser, T. J. (2007): Thyroid hormone transport by monocarboxylate transporters, *Best.Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab* (Band 21), Nr. 2, Seite 223-236. URL: PM:17574005

Vogelstein, B. und Gillespie, D. (1979): Preparative and analytical purification of DNA from agarose, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 76), Nr. 2, Seite 615-619. URL: PM:284385

vom Saal, F. S.; Akingbemi, B. T.; Belcher, S. M.; Birnbaum, L. S.; Crain, D. A.; Eriksen, M.; Farabollini, F.; Guillette, L. J., Jr.; Hauser, R.; Heindel, J. J.; Ho, S. M.; Hunt, P. A.; Iguchi, T.; Jobling, S.; Kanno, J.; Keri, R. A.; Knudsen, K. E.; Laufer, H.; LeBlanc, G. A.; Marcus, M.; McLachlan, J. A.; Myers, J. P.; Nadal, A.; Newbold, R. R.; Olea, N.; Prins, G. S.; Richter, C. A.; Rubin, B. S.; Sonnenschein, C.; Soto, A. M.; Talsness, C. E.; Vandenberg, J. G.; Vandenberg, L. N.; Walser-Kuntz, D. R.; Watson, C. S.; Welshons, W. V.; Wetherill, Y. und Zoeller, R. T. (2007): Chapel Hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure, *Reprod.Toxicol.* (Band 24), Nr. 2, Seite 131-138. URL: PM:17768031

Wagner, R. L.; Huber, B. R.; Shiau, A. K.; Kelly, A.; Cunha Lima, S. T.; Scanlan, T. S.; Apriletti, J. W.; Baxter, J. D.; West, B. L. und Fletterick, R. J. (2001): Hormone selectivity in thyroid hormone receptors, *Mol.Endocrinol.* (Band 15), Nr. 3, Seite 398-410. URL: PM:11222741

Wallace, R. B.; Johnson, M. J.; Suggs, S. V.; Miyoshi, K.; Bhatt, R. und Itakura, K. (1981): A set of synthetic oligodeoxyribonucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR322, *Gene* (Band 16), Nr. 1-3, Seite 21-26. URL: PM:6282692

Walle, T.; Hsieh, F.; DeLegge, M. H.; Oatis, J. E., Jr. und Walle, U. K. (2004): High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans, *Drug Metab Dispos.* (Band 32), Nr. 12, Seite 1377-1382. URL: PM:15333514

Weber, T.; Zimmermann, U.; Winter, H.; Mack, A.; Kopschall, I.; Rohbock, K.; Zenner, H. P. und Knipper, M. (2002): Thyroid hormone is a critical determinant for the regulation of the cochlear motor protein prestin, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 99), Nr. 5, Seite 2901-2906. URL: PM:11867734

Weinberger, C.; Thompson, C. C.; Ong, E. S.; Lebo, R.; Gruol, D. J. und Evans, R. M. (1986): The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor, *Nature* (Band 324), Nr. 6098, Seite 641-646. URL: PM:2879243

Weitzel, J. M.; Hamann, S.; Jauk, M.; Lacey, M.; Filbry, A.; Radtke, C.; Iwen, K. A.; Kutz, S.; Harneit, A.; Lizardi, P. M. und Seitz, H. J. (2003): Hepatic gene expression patterns in thyroid hormone-treated hypothyroid rats, *J.Mol.Endocrinol.* (Band 31), Nr. 2, Seite 291-303. URL: PM:14519097

Weitzel, J. M.; Kutz, S.; Radtke, C.; Grott, S. und Seitz, H. J. (2001a): Hormonal regulation of multiple promoters of the rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene: identification of a complex hormone-response element in the ubiquitous promoter B, *Eur.J.Biochem.* (Band 268), Nr. 14, Seite 4095-4103. URL: PM:11454004

- Weitzel, J. M.; Radtke, C. und Seitz, H. J. (2001b): Two thyroid hormone-mediated gene expression patterns in vivo identified by cDNA expression arrays in rat, *Nucleic Acids Res.* (Band 29), Nr. 24, Seite 5148-5155. URL: PM:11812848
- Wen, Z.; Dumas, T. E.; Schrieber, S. J.; Hawke, R. L.; Fried, M. W. und Smith, P. C. (2007): Pharmacokinetics and Metabolic Profile of Free, Conjugated and Total Silymarin Flavonolignans in Human Plasma after Oral Administration of Milk Thistle Extract, *Drug Metab Dispos.* URL: PM:17913795
- Wetherill, Y. B.; Akingbemi, B. T.; Kanno, J.; McLachlan, J. A.; Nadal, A.; Sonnenschein, C.; Watson, C. S.; Zoeller, R. T. und Belcher, S. M. (2007): In vitro molecular mechanisms of bisphenol A action, *Reprod.Toxicol.* (Band 24), Nr. 2, Seite 178-198. URL: PM:17628395
- White, R.; Jobling, S.; Hoare, S. A.; Sumpter, J. P. und Parker, M. G. (1994): Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic, *Endocrinology* (Band 135), Nr. 1, Seite 175-182. URL: PM:8013351
- Wiersinga, W. M.; Chopra, I. J. und Solomon, D. H. (1982): Specific nuclear binding sites of triiodothyronine and reverse triiodothyronine in rat and pork liver: similarities and discrepancies, *Endocrinology* (Band 110), Nr. 6, Seite 2052-2058. URL: PM:7075548
- Wilkening, S.; Stahl, F. und Bader, A. (2003): Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hepg2 with regard to their biotransformation properties, *Drug Metab Dispos.* (Band 31), Nr. 8, Seite 1035-1042. URL: PM:12867492
- Wolff, M. S.; Teitelbaum, S. L.; Windham, G.; Pinney, S. M.; Britton, J. A.; Chelimo, C.; Godbold, J.; Biro, F.; Kushi, L. H.; Pfeiffer, C. M. und Calafat, A. M. (2007): Pilot study of urinary biomarkers of phytoestrogens, phthalates, and phenols in girls, *Environ.Health Perspect.* (Band 115), Nr. 1, Seite 116-121. URL: PM:17366830
- Woo, G. H.; Shibutani, M.; Ichiki, T.; Hamamura, M.; Lee, K. Y.; Inoue, K. und Hirose, M. (2006): A repeated 28-day oral dose toxicity study of nonylphenol in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening of endocrine-disrupting chemicals, *Arch.Toxicol.* URL: PM:16847671
- Woo, G. H.; Shibutani, M.; Ichiki, T.; Hamamura, M.; Lee, K. Y.; Inoue, K. und Hirose, M. (2007): A repeated 28-day oral dose toxicity study of nonylphenol in rats, based on the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening of endocrine-disrupting chemicals, *Arch.Toxicol.* (Band 81), Nr. 2, Seite 77-88. URL: PM:16847671
- Wood, W. M.; Dowding, J. M.; Bright, T. M.; McDermott, M. T.; Haugen, B. R.; Gordon, D. F. und Ridgway, E. C. (1996): Thyroid hormone receptor beta2 promoter activity in pituitary cells is regulated by Pit-1, *J.Biol.Chem.* (Band 271), Nr. 39, Seite 24213-24220. URL: PM:8798664
- Wrutniak, C.; Cassar-Malek, I.; Marchal, S.; Rasclé, A.; Heusser, S.; Keller, J. M.; Flechon, J.; Dauca, M.; Samarut, J.; Ghysdael, J. und . (1995): A 43-kDa protein related to c-Erb A alpha 1 is located in the mitochondrial matrix of rat liver, *J.Biol.Chem.* (Band 270), Nr. 27, Seite 16347-16354. URL: PM:7608204
- Wu, S. Y.; Green, W. L.; Huang, W. S.; Hays, M. T. und Chopra, I. J. (2005): Alternate pathways of thyroid hormone metabolism, *Thyroid* (Band 15), Nr. 8, Seite 943-958. URL: PM:16131336

Wuttke, W.; Jarry, H.; Westphalen, S.; Christoffel, V. und Seidlova-Wuttke, D. (2002): Phytoestrogens for hormone replacement therapy?, *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* (Band 83), Nr. 1-5, Seite 133-147. URL: PM:12650710

Yalcin, Y.; Carman, D.; Shao, Y.; Ismail-Beigi, F.; Klein, I. und Ojamaa, K. (1999): Regulation of Na/K-ATPase gene expression by thyroid hormone and hyperkalemia in the heart, *Thyroid* (Band 9), Nr. 1, Seite 53-59. URL: PM:10037077

Yamada-Okabe, T.; Satoh, Y. und Yamada-Okabe, H. (2003): Thyroid hormone induces the expression of 4-1BB and activation of caspases in a thyroid hormone receptor-dependent manner, *Eur.J.Biochem.* (Band 270), Nr. 14, Seite 3064-3073. URL: PM:12846840

Yamano, K.; Araki, K.; Sekikawa, K. und Inui, Y. (1994): Cloning of thyroid hormone receptor genes expressed in metamorphosing flounder, *Dev.Genet.* (Band 15), Nr. 4, Seite 378-382. URL: PM:7923940

Yen, P. M. (2001): Physiological and molecular basis of thyroid hormone action, *Physiol Rev.* (Band 81), Nr. 3, Seite 1097-1142. URL: PM:11427693

Yen, P. M. (2006): Thyroid hormones and 3,5-diiodothyropropionic acid: new keys for new locks, *Endocrinology* (Band 147), Nr. 4, Seite 1598-1601. URL: PM:16543378

Yen, P. M.; Ando, S.; Feng, X.; Liu, Y.; Maruvada, P. und Xia, X. (2006): Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels, *Mol.Cell Endocrinol.* (Band 246), Nr. 1-2, Seite 121-127. URL: PM:16442701

Yen, P. M.; Brubaker, J. H.; Apriletti, J. W.; Baxter, J. D. und Chin, W. W. (1994): Roles of 3,5,3'-triiodothyronine and deoxyribonucleic acid binding on thyroid hormone receptor complex formation, *Endocrinology* (Band 134), Nr. 3, Seite 1075-1081. URL: PM:8119145

Yen, P. M.; Feng, X.; Flamant, F.; Chen, Y.; Walker, R. L.; Weiss, R. E.; Chassande, O.; Samarut, J.; Refetoff, S. und Meltzer, P. S. (2003): Effects of ligand and thyroid hormone receptor isoforms on hepatic gene expression profiles of thyroid hormone receptor knockout mice, *EMBO Rep.* (Band 4), Nr. 6, Seite 581-587. URL: PM:12776178

Zoeller, R. T. (2007): Environmental chemicals impacting the thyroid: targets and consequences, *Thyroid* (Band 17), Nr. 9, Seite 811-817. URL: PM:17956155

Zoeller, R. T. (2005): Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: new studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals?, *Mol.Cell Endocrinol.* (Band 242), Nr. 1-2, Seite 10-15. URL: PM:16150534

Zoeller, R. T. und Tan, S. W. (2007): Implications of research on assays to characterize thyroid toxicants, *Crit Rev.Toxicol.* (Band 37), Nr. 1-2, Seite 195-210. URL: PM:17364709

Zoeller, R. T.; Tan, S. W. und Tyl, R. W. (2007a): General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis, *Crit Rev.Toxicol.* (Band 37), Nr. 1-2, Seite 11-53. URL: PM:17364704

Zoeller, R. T.; Tyl, R. W. und Tan, S. W. (2007b): Current and potential rodent screens and tests for thyroid toxicants, *Crit Rev.Toxicol.* (Band 37), Nr. 1-2, Seite 55-95. URL: PM:17364705

## Publikationsverzeichnis

### Originalarbeiten

1. Wagner O, Schüler H, Hofmann P, Langer D, Dancker P, Bereiter-Hahn J  
Sound attenuation of polymerizing actin reflects supramolecular structures: viscoelastic properties of actin gels modified by cytochalasin D, profilin and  $\alpha$ -actinin.  
*Biochem. J.* **355**, 771-778 (2001).
2. Schmutzler C, Hamann I, Hofmann PJ, Kovacs G, Stemmler L, Mentrup B, Schomburg L, Ambrugger P, Grüters A, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W, Köhrle J  
Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney.  
*Toxicology* **205** (1-2), 95-102 (2004)
3. Schmutzler C, Gotthardt I, Hofmann PJ, Radovic B, Kovacs G, Stemmler L, Nobis I, Bacinski A, Mentrup B, Ambrugger P, Grüters A, Malendowicz L K, Christoffel J, Jarry H, Seidlovà-Wuttke D, Wuttke W and Köhrle J  
Endocrine Disruptors and the Thyroid Gland - A Combined *in Vitro* and *in Vivo* Analysis of Potential New Biomarkers.  
*Environ Health Perspect* **115** Supplement 1, 77-83 (2007)
4. In Begutachtung  
Renko K, Hofmann PJ, Stoedter M; Hollenbach B, Behrends T, Köhrle J, Schweizer U and Schomburg L  
Down-regulation of the hepatic selenoprotein biosynthesis machinery impairs selenium metabolism during the acute phase response in mice.  
*FASEB J.*
5. In Vorbereitung  
Hofmann PJ, Schomburg L and Köhrle J  
Endocrine disrupters interfering with thyroid hormone receptor-mediated transactivation.

**Buchartikel**

1. Heynisch B, Renko K, Hollenbach B, Hofmann PJ, Schweizer U, Köhrle J and Schomburg L  
On the influence of aminoglycoside antibiotics on the biosynthesis of selenoproteins.  
*Köhrle J und Schmutzler C: Mineralstoffe – Molekularbiologie – Medizin: Herbert Utz Verlag GmbH (2007), ISBN 978-3-8316-0732-7, p86 – 92.*
2. Renko K, Hofmann PJ, Hollenbach B, Schweizer U, Köhrle J and Schomburg L  
Altered selenoprotein expression during acute phase response in mice.  
*Köhrle J und Schmutzler C: Mineralstoffe – Molekularbiologie – Medizin: Herbert Utz Verlag GmbH (2007), ISBN 978-3-8316-0732-7, p108 – 114.*

**Abstracts**

1. Kovacs G, Hofmann P, Hamann I, Schmutzler C, Wuttke W, Jarry H, Köhrle J  
Endocrine disruptors alter expression of the thyroid hormone-responsive gene malic enzyme in female rats.  
*Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **112** S170, P172, 2004
2. Hamann I, Hofmann P, Schmutzler C, Mentrup B, Huhne K, Jarry H, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W, Köhrle J  
4MBC and OMC, components of UV-sunscreens, exert organ specific alterations on type I 5'-Deiodinase activity and expression in female rats.  
*Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **113** S61, 138, 2005
3. Hofmann PJ, Schomburg L, Köhrle J  
Potential of selected ED to interfere with TH-dependent transcriptional regulation.  
*Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **115** S1, 21, 2007

### Vorträge

1. Hofmann PJ

Towards the construction of a Thyroid Hormone Reporter System.

19. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF); Halle (11.-13.12.2003)

2. Hofmann PJ

Screening of endocrine disruptors using a novel T3-dependent luciferase-based reporter assay.

7th DGE Young Active Research Meeting „Men, Mice & Mutations“; Berlin (07.-10.10.2005)

3. Hofmann PJ

Potential of selected ED to interfere with TH-dependent transcriptional regulation.

22. Arbeitstagung Experimentelle Schilddrüsenforschung (AESF); Berlin 07.-09.12.2006

4. Hofmann PJ, Schomburg L, Köhrle J

Screening potential endocrine disruptors of T<sub>3</sub>-dependent transcriptional regulation.

32nd Annual Meeting Of The European Thyroid Association; Leipzig 01.-05.09.2007

### Poster

1. Hofmann PJ, Hamann I, Stemmler L, Kovacs G, 2, Schmutzler C, Jarry H, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W and Köhrle J  
Endocrine Disrupters affect hepatic T3-responsive proteins.  
Summerschool on Endocrinology 2004; Bregenz/Österreich (25.07.-29.07.2004)
2. Hofmann PJ, Schomburg L, Schmutzler C, and Köhrle J  
Analysis of endocrine disruptor effects on thyroid hormone mediated gene transcription in vitro.  
CREDO Cluster Workshop on „Multi-organic Risk Assessment of Endocrine Disrupters”; Prag, Tschechien (2005)
3. Hofmann PJ, Schomburg L, Schmutzler C, and Köhrle J  
Screening of EAC using a new T3-dependent luciferase-based reporter assay.  
Summerschool on Endocrinology 2005; Bregenz/Österreich (31.07.-04.08.2005)
4. Hamann I, Hofmann PJ, Schmutzler C, Mentrup B, Huhne K, Jarry H, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W and Köhrle J  
Endocrine Disruptors Alter Expression of the Thyroid Hormone-responsive Gene Malic Enzyme in Female Rats.  
48. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie; Dresden (23.02.2004)
5. Hamann I, Stemmler L, Hofmann PJ, Kovacs G, Schmutzler C, Jarry H, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W and Köhrle J  
The Effect of Endocrine Disrupters on T3-regulated Endpoints in Liver, Kidney and Heart in Female Rats.  
CREDO Cluster Workshop on “Multi-organic Risk Assessment of Endocrine Disrupters”; Illetas (Mallorca)/Spanien (01.04.2004)
6. Hamann I, Hofmann PJ, Schmutzler C, Mentrup B, Huhne K, Jarry H, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W and Köhrle J  
4MBC and OMC, Components of UV-sunscreens, Exert Organ Specific Alterations of Type I 5'-Deiodinase Activity and Expression in Female Rats.  
49. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie; Münster (02.03.2005)

7. Köhrle J, Hamann I, Hofmann PJ, Radovic B, Schmutzler C  
Assessment of effects of endocrine disrupting chemicals (EDC) on the thyroid axis -  
a combined in vitro and in vivo approach  
(04.03.2005 - 07.06 2005)
  
8. Renko K, Hofmann PJ, Hollenbach B, Schweizer U, Köhrle J and Schomburg L  
Altered selenoprotein expression profiles during acute phase response in mice  
22. Jahrestagung der Gesellschaft für Mineralstoffe und Spurenelemente e.V.  
(GMS) 9.-11.11 2006, Berlin
  
9. Hofmann PJ, Schomburg L, Köhrle J  
Potential of selected ED to interfere with TH-dependent transcriptional regulation.  
51. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie; Salzburg  
(07.03.2007 – 10.03.2007)

Berlin, den \_\_\_\_\_

---

(Peter Hofmann)



### **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur auf Grundlage der angegebenen Hilfsmittel und Literatur verfasst habe. Des Weiteren erkläre ich meine Kenntnisnahme der dem angestrebten Verfahren zugrunde liegenden Promotionsverordnung. Ich versichere, dass ich diese Arbeit weder in dieser noch in einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe und dass ich nicht im Besitz eines entsprechenden Doktorgrades bin.

Berlin, den \_\_\_\_\_

---

(Peter Hofmann)

## Anhang

### Plasmid-Sequenzen

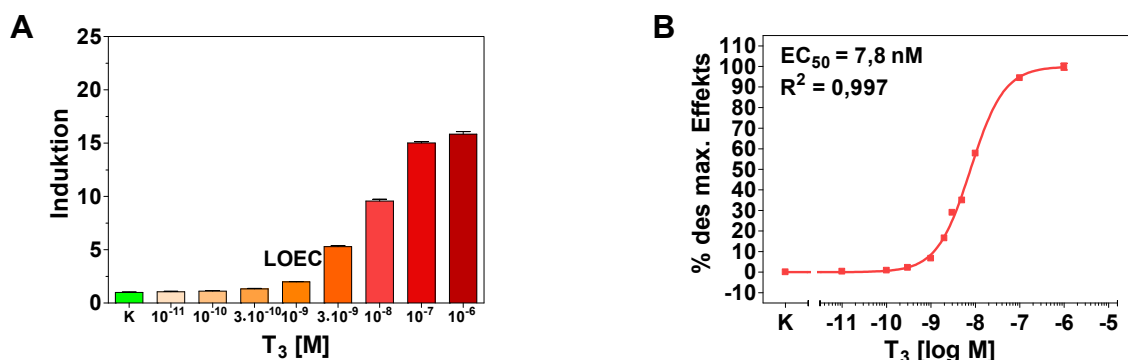
Plasmid	Insert
p(DR4) <sub>2</sub> -SV40- <i>luc</i> +	GATCCTAAGGTCACCTTCAGGTCAGT
p(DR4) <sub>2</sub> -SV40- <i>luc</i> + 1	AATTCAGTATGATTTCCTAAGGTCACCTTCAGGTCAGTGGATCCTAAGGTCACCTTCAGGTCAGTGGATCAATCGAATT
p(DR4) <sub>2</sub> -SV40- <i>luc</i> + 2	AATTCAGTATGATTTCCTAAGGTCACCTTCAGGTCAGTGGATCCTAAGGTCACCTTCAGGTCAGTGGATCAATCGAATT
p(DR4) <sub>2</sub> -SV40- <i>luc</i> + 3	AATTCAGTATGATTTCCTAAGGTCACCTTCAGGTCAGTGGATCCTAAGGTCACCTTCAGGTCAGTGGATCAATCGAATT
p(DR4) <sub>2</sub> -SV40- <i>luc</i> + 4	AATTCAGTATGATTTCCTAAGGTCACCTTCAGGTCAGTGGATCCTAAGGTCACCTTCAGGTCAGTGGATCAATCGAATT
p(negTRE) <sub>2</sub> -SV40- <i>luc</i> +	GATCCTGACCTTTGGGGACCTG
p(negTRE) <sub>2</sub> -SV40- <i>luc</i> + 1	AATTCGATTATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCAATCACTAGTGAATT
p(negTRE) <sub>2</sub> -SV40- <i>luc</i> + 2	AATTCGATTATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCAATCACTAGTGAATT
p(negTRE) <sub>2</sub> -SV40- <i>luc</i> + 3	AATTCGATTATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCAATCACTAGTGAATT
p(negTRE) <sub>2</sub> -SV40- <i>luc</i> + 4	AATTCGATTATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCCTGACCTTTGGGGACCTGGATCAATCACTAGTGAATT

**Abb. 37: Plasmid-Sequenzen**

Hier dargestellt sind die Ergebnisse der Reporter-Plasmid-Sequenzierungen

### T<sub>3</sub>-Dosis-Wirkungskurve in Hormon-gestripptem FBS

Zum Vergleich wurde der Assay auch unter Verwendung von hormon-gestrippten FBS durchgeführt. Zur Pooltransfektion in T75 Zellkulturflaschen wurden  $1,2 \cdot 10^7$  HepG2 Zellen in DMEM/F12 + 10 % hormon-gestrippten FBS pro Flasche ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 22,5 µg p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc* und 7,5 µg pRS-hTRβ<sub>1</sub> unter Verwendung von 150 µL PolyFect transfiziert. Nach 8 h wurden je  $1 \cdot 10^5$  Zellen pro Well in eine sterile 96-Well Lumineszenzmessplatte überführt. Nach einer Ruhephase von 16 h wurden die Zellen in Quadruplikaten für 24 h mit der Lösungsmittelkontrolle bzw. steigenden T<sub>3</sub>-Konzentrationen inkubiert. Darauf erfolgte die Zellyse und der Luziferase-Assay. Die T<sub>3</sub>-Dosis-Wirkungskurve wies eine Maximalinduktion 15,8-fach und einen EC<sub>50</sub>-Wert von ca. 7,8 nM auf (Abb. 38 A, B). Durch statistische Analyse mittels ANOVA und Dunnett-Test wurde eine minimale effektive Konzentration von  $3 \cdot 10^{-10}$  M T<sub>3</sub> bestimmt.



**Abb. 38: T<sub>3</sub>-Dosis-Wirkungskurven in HepG2 Zellen mit hormon-gestrippten FBS**

$1,2 \cdot 10^7$  HepG2 Zellen wurden in DMEM ohne Phenolrot + 10 % hormon-gestrippten FBS auf T75 Zellkulturflaschen verteilt. Am folgenden Tag wurden die Zellen unter Verwendung von 150 µL PolyFect mit 22,4 µg p(DR4)<sub>2</sub>-SV40-*luc* und 7,5 µg hTRβ pro T75 Zellkulturflasche transfiziert. Nach 8 h wurden je  $1 \cdot 10^5$  Zellen pro Well eine sterile 96-Well Lumineszenzmessplatte umgesetzt und für 18 h ruhen gelassen. Es folgte die Inkubation mit steigenden Konzentrationen von T<sub>3</sub> bzw. mit der Lösungsmittelkontrolle. Die Ansätze wurden nicht gewaschen, sondern direkt mit T<sub>3</sub> inkubiert. Weitere 24 h später wurden Luziferase-Assays durchgeführt. In (A) wird die Induktion der Luziferase in Bezug auf die Lösungsmittelkontrolle gezeigt. In (B) wird die entsprechende Dosis-Wirkungskurve mit den EC<sub>50</sub>-Wert dargestellt. Die Dosis-Wirkungskurve und der EC<sub>50</sub>-Wert wurden mit der Funktion „sigmoidal dose-response“ der Software GraphPad Prism 4 berechnet. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von je 4 Replikaten ± SEM.